

616.506
sus
p c1

PENGARUH KOMBINASI TRIAMSIKOLON ASETONID DAN
5 FLUOROURASIL PADA BIAKAN FIBROBLAS
JARINGAN KELOID
KAJIAN DENGAN *FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN*
LATTICE DAN *AGYROPHYLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION*

SUSILOWATI

NIM G3J000086

Laporan Penelitian Program Pendidikan Dokter Spesialis I

Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin

Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro



BAGIAN/SMF ILMU KESEHATAN KULIT DAN KELAMIN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS DIPONEGORO

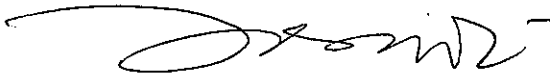
RS DR KARIADI SEMARANG

2004

Dipertahankan di depan Panitia Penguji Karya Akhir
Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/RS Dr.Kariadi Semarang

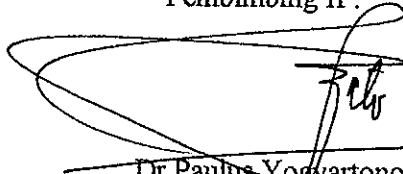
Menyetujui :

Pembimbing I :



Dr. TM. Sri Redjeki S, SpKK(K)
NIP. 140091565

Pembimbing II :

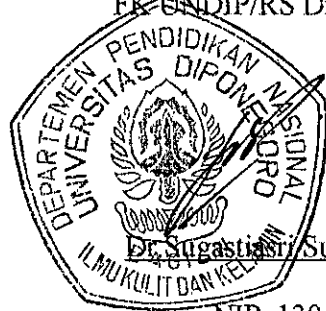


Dr. Paulus Yogyartono SpKK(K)
NIP. 140147110

Karya Akhir ini dikerjakan di Laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK UGM Yogyakarta

Mengetahui :

Ketua Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin
FK UNDIP/RS Dr.Kariadi Semarang



Dr. Sugastia Sumaryo, SpKK (K)

NIP. 130 354 880

UPT-PUSTAK-UNDIP

No. Daft: 3621 / TI / FK / 4
Tgl: 26 Mei 2015

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang atas rahmat dan hidayahNya sehingga saya mendapatkan kesempatan dan kemampuan untuk menyelesaikan karya akhir ini dengan judul :

PENGARUH KOMBINASI TRIAMINOLON ASETONID DAN 5 FLUOROURASIL PADA BIAKAN FIBROBLAS JARINGAN KELOID. KAJIAN DENGAN *FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE* DAN *AGYROPHYLLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION*.

Sebagai salah satu syarat bagi peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis I dalam bidang studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang.

Kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dan Direktur Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang, saya mengucapkan terima kasih atas ijin dan kesempatan yang diberikan kepada saya untuk menyelesaikan pendidikan spesialisasi di Bagian / SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang.

Pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan ucapan terima kasih yang tidak terhingga kepada yang terhormat :

1. Dr.Sugastiasri Sumaryo, SpKK (K), Ketua Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk belajar di bagian ini serta atas bimbingan, dorongan dan nasihat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
2. Dr.Moch.Affandi, SpKK (K), Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang yang telah memberikan kesempatan untuk belajar di bagian ini kepada saya selama mengikuti pendidikan spesialisasi.
3. Dr.Paulus Yogyartono,SpKK (K), selaku Pjs. Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi yang telah membimbing, mendorong, dan memberikan nasihat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi dan juga

atas kesediaan beliau menjadi pembimbing pada penyusunan usulan penelitian ini yang tidak mungkin selesai dengan tanpa koreksi, pengarahan dan petunjuk beliau.

4. Dr.TM Sri Redjeki S, SpKK (K), selaku pembimbing utama dalam penyusunan karya akhir ini, yang telah memberikan masukan, koreksi, petunjuk dan pengarahan serta dorongan pada pembuatan karya akhir ini sehingga dapat selesai pada waktunya. Dan juga atas segala bimbingan dan nasihat yang diberikan selama saya mengikuti pendidikan.
5. Prof.Dr.Kabulrachman, SpKK (K), Guru Besar Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang, yang telah membimbing dan memberikan dorongan selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
6. Dr.S.Indrayanti, SpKK (K), selaku Sekretaris Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang yang telah memberikan bimbingan, dorongan dan nasihat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
7. Dr.Meilien Himbawani, SpKK (K) selaku Sekretaris Bagian Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang yang telah membimbing, mendorong dan memberi nasihat yang berharga selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
8. Dr.S.Buditjahjono, SpKK (K); Dr.Subakir, SpKK (K),SpMK; Dr.Soejoto,SpKK (K); Dr.Prasetyowati Subchan, SpKK (K); Dr.Irma Binarso, SpKK (K); Dr.R.Sri Djoko Susanto, SpKK (K); Dr.Lewie Suryaatmadja, SpKK (K); Dr.med.Kun Jayanata,SpKK; Dr.Dhiana Ernawati, SpKK (K); Dr.Asih Budiastuti, SpKK (K), Dr.Diah Adriani Malik, SpKK dan Dr.Indra Wijaya,SpPA atas segala bimbingan dan petunjuk serta nasihat yang berguna selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
9. Prof.Dr.dr.Hardyanto Soebono, SpKK(K), Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada / Rumah Sakit Dr.Sardjito Yogyakarta atas ijin yang diberikan kepada saya untuk melakukan penelitian di FK UGM.
10. Dr.Y.Widodo Wirohadidjojo, SpKK (K), selaku Ketua Bagian/SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/

Rumah Sakit Dr.Sardjito Yogyakarta yang telah memberi ijin, membimbing penelitian sehingga saya dapat menyelesaikannya.

11. Dr.Fajar Waskito,MS.SpKK(K), Ketua Program Studi Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/ Rumah Sakit Dr.Sardjito Yogyakarta yang telah memberikan saya kesempatan untuk melakukan penelitian di bagian Kulit dan Kelamin FK UGM.
12. Prof dr.Sri Kadarsih, Phd, Msc, Guru Besar Bagian Ilmu Faal , Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada/ Rumah Sakit Dr.Sardjito yang telah mengijinkan saya menggunakan fasilitas mikroskop bermonitor sehingga memperlancar penelitian.
13. Seluruh teman sejawat peserta Program Pendidikan Dokter Spesialis, paramedis, karyawan di Bagian /SMF Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro/ Rumah Sakit Dr.Kariadi Semarang atas segala bantuan dan kerjasamanya selama saya mengikuti pendidikan spesialisasi.
14. Dr.dr.Hertanto Wahyu Subagyo, MS.SpGK dan dr.Niken Purihito,M Med.Sc.SpGK yang memberi petunjuk dalam penyusunan proposal serta pengolahan data karya akhir ini.
15. Kedua orangtua saya, Soetedja Handaya dan Megawati yang telah membesarkan dan mendidik saya, suami tercinta Ir.Mulyono, yang selalu memberi semangat dan doa selama saya menjalani pendidikan.
16. Kepada semua saudaraku yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu atas segala dukungan semangat dan doa bagi keberhasilan saya.

Kiranya Tuhan Yang Maha Pengasih dan Penyayang selalu melimpahkan berkatNya atas keikhlasan dan budi baik dari semua pihak yang telah membantu dan memperkenalkan saya menyelesaikan program pendidikan spesialisasi di Bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin ini.

Akhir kata “tiada gading yang tak retak”. Semoga karya akhir ini dapat memberikan manfaat bagi siapapun yang membacanya dan segala kritik serta saran yang membangun senantiasa saya terima dengan kebesaran hati.

Semarang, Desember 2004

Susilowati

DAFTAR ISI

	Halaman
JUDUL PENELITIAN	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GRAFIK	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
ABSTRAK	x
ABSTRACT	xi
 BAB I. PENDAHULUAN	 1
A. LATAR BELAKANG	1
B. RUMUSAN MASALAH	2
C. ORISINALITAS PENELITIAN	2
D. TUJUAN PENELITIAN	3
E. MANFAAT PENELITIAN	3
 BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. KELOID	3
1. Definisi	3
2. Etiologi dan patogenesis	3
3. Pengobatan keloid	6
B. KOLAGEN	8
1. Macam dan susunan kolagen	8
2. Sintesis kolagen	10
3. Degradasi kolagen	13
C. BIAKAN FIBROBLAS	14
D. <i>FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE</i>	16
E. <i>AGYROPHYLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION</i>	16
F. TRIAMSIKOLON ASETONID	17

G. 5 FLUOROURASIL	19
H. KERANGKA TEORI	21
I. KERANGKA KONSEP	22
J. HIPOTESIS	22
 BAB III. METODE PENELITIAN	
A. POPULASI DAN SAMPEL	26
B. VARIABEL PENELITIAN	26
C. BAHAN PENELITIAN	27
D. ALAT PENELITIAN	28
E. TEMPAT DAN LAMA PENELITIAN	29
F. DEFINISI OPERASIONAL	29
G. ALUR PENELITIAN	31
H. ANALISIS	37
J. KESULITAN DALAM PENELITIAN	38
 BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....	
39	
 BAB V . KESIMPULAN DAN SARAN	
50	
A. Kesimpulan	50
B. Saran	50
 BAB VI. RINGKASAN	
52	
SUMMARY	54
 DAFTAR PUSTAKA	
56	
LAMPIRAN	60

DAFTAR GRAFIK

	halaman
Grafik 1. Hambatan kontraksi <i>FPCL</i> terhadap berbagai dosis TA.....	39
Grafik 2. Indek proliferasi terhadap berbagai dosis TA.....	40
Grafik 3. Hambatan kontraksi <i>FPCL</i> terhadap berbagai dosis 5FU	42
Grafik 4. Indek proliferasi terhadap berbagai dosis 5FU.....	43
Grafik 5. Hambatan kontraksi <i>FPCL</i> terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> terbesar dibandingkan kontrol.....	44
Grafik 6. Indek proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar dibandingkan kontrol.....	45
Grafik 7. Hambatan kontraksi <i>FPCL</i> terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> terbesar dibandingkan TA dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> yang terbesar.....	46
Grafik 8. Indek proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar dibandingkan TA dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar.....	47
Grafik 9. Hambatan kontraksi <i>FPCL</i> terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> terbesar dibandingkan 5FU dosis yang menghambat kontraksi <i>FPCL</i> yang terbesar.....	48
Grafik 10. Indek proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar dibandingkan TA dosis yang menghambat indek proliferasi terbesar.....	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1. Data hasil penelitian	60
Lampiran 2. Keluaran SPSS	61
Lampiran 3. Peralatan, bahan dan hasil penelitian	68

ABSTRAK

Triamsinolon asetonid (TA) sering dipakai untuk pengobatan keloid yang diduga bekerja dengan menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas. Tetapi sampai saat ini belum ada pengobatan keloid yang hasilnya memuaskan sehingga pada penelitian ini dicobakan kombinasi TA dan 5 Fluorourasil (5FU) dengan harapan dapat meningkatkan efeknya dengan uji *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)* dan *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)*

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group Design* yang menggunakan sel-sel fibroblas yang dikultur dalam sumuran sebagai obyek penelitian. Sampel dikelompokkan menjadi 12 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok perlakuan kontrol (TA-5FU-), kelompok perlakuan pemaparan tunggal (TA10 5FU-, TA20 5FU-, TA-5FU0,1, TA-5FU1, TA-5FU10) dan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi (TA20 5FU10). Hambatan *FPCL* dihitung dengan *Scion Image* dan Indeks Proliferasi dihitung berdasarkan rerata jumlah *NOR* dalam 100 sel. Percobaan dilakukan secara triplo.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan hambatan *FPCL* dan indeks proliferasi antara kelompok perlakuan pemaparan tunggal dibandingkan dengan kelompok kontrol, adanya perbedaan hambatan *FPCL* antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dengan kelompok kontrol, adanya perbedaan hambatan *FPCL* antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dibandingkan kelompok perlakuan tunggal tetapi tidak ada perbedaan indeks proliferasi yang bermakna secara statistik antara kelompok perlakuan pemaparan TA tunggal dibandingkan kelompok kontrol, antara kelompok perlakuan TA-5FU0,1 dan TA-5FU1 tetapi terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara indeks proliferasi TA-5FU0,1 dan TA-5FU10. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemaparan kombinasi TA dan 5FU dapat meningkatkan penghambatan sintesis kolagen secara bermakna yang berbanding lurus dengan dosis obat tetapi efek penurunan indeks proliferasi kombinasi TA dan 5FU tidak berbeda secara bermakna dengan 5FU tunggal, dan berbeda secara bermakna dengan TA tunggal.

Kata kunci : Triamsinolon asetonid, 5 Fluorourasil, *Fibroblast Populated Collagen Lattice* dan *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region*.

ABSTRACT

Triamcinolone acetonide (TA) has frequently been used as a keloid therapy that was thought to have an inhibition on collagen synthesis and fibroblast proliferation. But up till now there is no satisfying result on keloid therapy. So that in this study we tried a combination of TA and 5FU in the hope to increase the effectiveness by doing the *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)* and *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)* tests.

This laboratory-experimental study was designed as a *Post test-only control group* using cultured fibroblast cells that was cultured in wells as experimental objects. All samples were divided into twelve treatment groups consisted of control group (TA-5FU-); single-exposed treatment groups (TA10 5FU-, TA20 5FU-, TA-5FU0,1, TA-5FU1, TA-5FU10) and combination-exposed treatment groups (TA20 5FU10). *FPCL* inhibition was assessed using *Scion Image* and proliferation index was assessed based on the average of NOR on 100 cells. Experiment was done triplo.

It was shown in this study that there were significant differences on *FPCL* inhibition and proliferation index between single-exposed treatment groups with control group, *FPCL* inhibition between combination-exposed treatment groups with control group, between combination-exposed treatment groups with single-exposed treatment groups but there were no significant differences on proliferation index between TA single-exposed treatment groups with control group, between TA-5FU0,1 treatment groups and TA-5FU1 but there was a significant difference on proliferation index between TA-5FU0,1 and TA-5FU10..

It can be concluded that the combination-exposure of TA and 5FU could increase collagen synthesis inhibition significantly that was in proportion with the drug dose but there was no significant difference on proliferation index between combinationTA and 5FU with single 5FU , yet there was a significant difference with single TA.

Key words : Triamcinolone acetonide. 5 Fluorouracil, *Fibroblast Populated Collagen Lattice* and *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region*.

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG PENELITIAN

Keloid adalah tumor benigna dari jaringan fibrosa yang padat, tidak berkapsul, batas tidak tegas, yang terjadi akibat pertumbuhan berlebih jaringan kolagen selama masa penyembuhan.¹ Keloid dapat mengenai semua orang, namun frekuensinya tinggi pada orang berkulit gelap, usia 10-30 tahun, lebih sering dijumpai pada wanita.²⁻⁴ Bergman dkk melaporkan insidennya 4,5 – 16% pada orang berkulit gelap.² Patogenitas keloid dianggap merupakan abnormalitas fase fibroblas pada proses penyembuhan luka, dimana terjadi peningkatan aktivitas fibroblas, peningkatan kolagen tipe III serta miofibroblas.⁵

Pengobatan keloid banyak pilihannya, namun tidak ada yang dapat menyembuhkan secara total dan terutama hanya ditujukan pada segi kosmetik dan mengurangi rasa tidak nyaman akibat pertumbuhan keloid berupa rasa gatal dan nyeri.^{4,6} Ada beberapa cara pengobatan keloid : bedah eksisi⁷⁻⁹, triamsinolon asetonid intralesi⁸⁻¹³, imunoterapi¹³, radiasi¹²⁻³, bebat tekan^{8,13}, 5 Fluorourasil¹²⁻⁵, bedah laser^{8,16-7}, gel silikon^{8,13}, bedah beku^{8,12}, verapamil^{16,18} maupun metotreksat¹². Injeksi Triamsinolon asetonid (TA) dengan kemampuan menekan proliferasi dan migrasi fibroblas, menekan sintesis kolagen dan aktivitas makrofag serta meningkatkan degradasi kolagen, merupakan terapi yang paling sering digunakan baik tunggal maupun dalam kombinasi^{11,13}. Terapi ini mempunyai beberapa kelemahan antara lain : rasa nyeri pada lokasi injeksi, munculnya efek samping : sindrom *Cushing*, hipopigmentasi di sekitar injeksi, teleangiectasis, shock

neurogenik dan perdarahan. Sebagian besar efek samping berhubungan dengan dosis akumulatif yang diberikan.^{10,19-21} 5 Fluorourasil (5FU) merupakan obat anti kanker (kemoterapi anti proliferaatif) yang berinteraksi dengan pertumbuhan sel-sel kanker dan memperlambat pertumbuhan dan penyebarannya dalam tubuh. Pada penelitian terapi keloid, 5FU bekerja dengan mencegah reorganisasi matrik ekstraseluler serta menghambat kontraksi *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)*^{15,22} Namun, kombinasi 5FU dengan TA pada biakan fibroblas jaringan keloid belum pernah dilakukan. Sekitar 50% penderita akan mengalami kekambuhan.⁸

Dengan alasan tersebut di atas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui efektifitas kombinasi TA dan 5FU pada biakan fibroblas jaringan keloid dalam menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas dengan *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)* dan *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)*.

B. RUMUSAN MASALAH

Berapakah dosis optimal kombinasi Triamsinolon asetonid dan 5 Fluorourasil yang dapat memberikan hambatan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas ?

C. ORISINALITAS PENELITIAN

Sebagian besar penelitian mengenai Triamsinolon asetonid dan 5 Fluorourasil berkisar pada masalah pengaruh masing-masing obat baik pada manusia maupun hewan coba. Triamsinolon asetonid dapat menekan proliferasi dan migrasi fibroblas, menekan aktivitas makrofag serta meningkatkan degradasi kolagen, sedangkan 5FU sebagai anti proliferaatif dapat menghambat proliferasi fibroblas. Penelitian ini menawarkan sesuatu yang baru untuk mengkombinasikan kedua obat untuk menimbulkan efek sinergisme sehingga diharapkan dapat memunculkan suatu formulasi baru yang cukup efektif untuk menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas.

D. TUJUAN PENELITIAN

-TUJUAN UMUM :

Mengetahui dosis optimal kombinasi Triamsinolon asetonid dan 5 Fluorourasil yang dapat memberikan hambatan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada percobaan in vitro.

-TUJUAN KHUSUS :

1. membuktikan adanya perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari TA dibandingkan dengan biakan fibroblas jaringan keloid yang tidak dipapari TA.
2. membuktikan adanya perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari 5FU dibandingkan dengan biakan fibroblas jaringan keloid yang tidak dipapari 5FU.
3. membuktikan adanya perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari kombinasi TA dan 5FU dibandingkan dengan biakan fibroblas yang tidak dipapari TA maupun 5FU.
4. membuktikan adanya perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari kombinasi TA dan 5FU dibandingkan dengan biakan fibroblas yang dipapari TA atau 5FU saja.

E. MANFAAT PENELITIAN

1. mengetahui seberapa besar pengaruh TA, 5FU dan kombinasinya terhadap penghambatan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas dalam biakan fibroblas jaringan keloid.
2. mengetahui dosis optimal untuk menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas
3. sebagai titik tolak penelitian lebih lanjut.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. KELOID

A.1. Definisi. Keloid adalah tumor benigna dari jaringan fibrosa yang padat, tak berkapsul, batas tak jelas, yang terjadi akibat pertumbuhan berlebih dari jaringan kolagen selama masa penyembuhan¹. Secara klinis dimulai dengan adanya papula eritematus kecil, berbatas tegas, yang tumbuh lambat secara teratur, dapat membentuk lesi : bulat, oval, atau tidak teratur, dengan perluasan eksentris, mencengkeram kulit sehat di sekitarnya.²³ Pertumbuhan berlebih dari jaringan kolagen tidak hanya terdapat pada keloid, tetapi juga dijumpai pada parut hipertrofik.⁴ Keduanya kadang sulit dibedakan, mungkin perbedaan antara kedua kelainan ini hanya berupa perbedaan tingkat dari proses yang mungkin berdasar sama¹. Data-data lain yang dapat menyokong penegakan diagnosis adalah : adanya rasa gatal atau nyeri, lesi halus yang bertangkai, dan perjalanan klinisnya. Perjalanan klinis parut hipertropis dapat mengecil secara spontan, sedangkan keloid jarang sekali mengalami involusi spontan.²⁴

A.2. Etiologi dan patogenesis. Etiologi keloid masih diperdebatkan, namun trauma memegang peranan penting. Falco mengatakan bahwa keloid dapat timbul setelah trauma atau setelah lesi kulit lainnya.³ Selain itu dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor misalnya faktor familial, lokasi lesi, usia dan jenis trauma.^{2,3,25}

Menurut Glucksman, keloid sebenarnya merupakan reaksi inflamasi terhadap adanya benda asing dalam kulit¹. Pendapat ini diperkuat Mackie (1992) yang

mengatakan bahwa benda asing tersebut dapat berupa : bakteri yang mendasari infeksi kulit, rambut, sampah keratin, debu dan pasir, dan serabut katun.²⁵⁻⁶

Jenis trauma yang mendasari timbulnya luka juga memegang peran penting dalam timbulnya keloid. Luka bakar dan luka yang terkelupas lebih sering menimbulkan keloid dibanding jenis luka lainnya.^{1,25}

Arah luka terhadap garis kulit juga berperan dalam merangsang timbulnya keloid. Luka dengan regangan berlebih, terutama bila arah regangan bertentangan dengan arah garis kulit, mempunyai risiko yang lebih besar untuk menjadi keloid.^{25,27}

Kontusi lokal yang menyebabkan adanya perdarahan di sekitar luka akan merangsang timbulnya keloid karena meningkatnya reaksi inflamasi, dan sebagai faktor risiko timbulnya infeksi.^{1,25} Perdarahan di bawah kulit akan menurunkan produksi interleukin 2, dan menurunkan respon proliferasi limfosit sehingga memperbesar risiko luka terinfeksi.²⁵ Infeksi yang terjadi, tidak saja memperberat reaksi inflamasi, tetapi juga merupakan salah satu faktor pencetus timbulnya keloid.²⁶

Keloid sering muncul pada daerah-daerah tertentu pada permukaan badan. Faktor anatomis ini mungkin berhubungan dengan : ketebalan kulit, frekuensi pergerakan pada daerah tersebut, dan besarnya regangan kulit setempat. Keloid lebih sering dijumpai pada : cuping telinga, pipi, leher, bahu, dada dan punggung bagian atas, serta tungkai bawah.^{25,27}

Pewarisan secara genetik juga dapat dilihat dengan ditemukannya keloid lebih banyak pada orang dengan golongan darah A, terutama pada ras negro.⁴

Faktor lainnya adalah faktor hormonal. Pendapat ini didasarkan pada temuan-temuan seperti : keloid jarang pada anak-anak atau orang tua dimana hormon seks

belum berfungsi optimal atau tidak lagi berfungsi baik, wanita lebih sering dibandingkan laki-laki, keloid akan bertambah besar selama kehamilan, keloid lebih sering muncul pasca tireoidektomi pada penderita muda, dan keloid sering muncul pada orang-orang akromegali.²⁵

Mekanisme pasti tentang peran kelenjar endokrin terhadap timbulnya keloid masih belum jelas. Perbedaan antara parut biasa dan keloid, atau juga dengan parut hipertropis, terletak pada perbedaan kecepatan sintesis dan degradasi kolagen selama masa penyembuhan luka. Pada penyembuhan luka yang normal, sintesis dan degradasi kolagen berjalan secara selaras dan seimbang; tetapi pada penderita keloid, proliferasi fibroblas berjalan lebih produktif dibandingkan kulit sekitar dan kulit normal.^{2,27}

Asam arakidonat merangsang aktivitas kolagenase, dan inflamasi terjadi akibat aktivitas prostaglandin yang berasal dari asam arakidonat. Awalnya, berubahnya asam arakidonat menjadi prostaglandin diduga menjadi sebab kurang efektifnya kolagenase. Pendapat tersebut dibantah dengan ditemukannya enzim kolagenase yang normal baik kualitatif maupun kuantitatif, meskipun ada juga peneliti yang menemukan penurunan enzim kolagenase.²⁷

Patogenesis keloid dianggap merupakan abnormalitas fase fibroblas pada proses penyembuhan luka, dimana terjadi peningkatan aktivitas fibroblas, peningkatan kolagen tipe III serta miofibroblas.⁵

A.3. Pengobatan keloid. Ada berbagai macam cara pengobatan keloid, diantaranya : bedah eksisi. Bedah eksisi sering dilakukan oleh ahli bedah, tetapi hasilnya tidak memuaskan. Pada suatu penelitian yang melibatkan 340 lesi keloid yang diamati

lebih dari 26 tahun setelah operasi, 50% penderita akan mengalami kekambuhan. Kekambuhan yang terjadi sering berupa keloid yang lebih berat dan lebih buruk dari keloid asal.⁸ Beberapa ahli bedah plastik menganjurkan teknik khusus untuk operasi keloid, yang semuanya berdasar pada teknik dasar operasi atraumatis, dengan modifikasi teknik eksisi intra keloid, Z plasti intra keloid, dan eksisi intra keloid yang diikuti dengan graft dengan donor epidermis keloid itu sendiri.^{1,16} Kedua adalah injeksi TA intra lesi. Cara ini didasarkan pada kemampuan triamsinolon menekan : proliferasi dan migrasi fibroblas, aktifitas makrofag dan meningkatkan degradasi kolagen.^{11,13} Efek farmakologik steroid juga akan muncul pada penggunaan TA ini, terutama efek depigmentasi dan atrofi sebagai akibat keluarnya steroid pada jaringan sehat, karena adanya tekanan yang kuat pada waktu infiltrasi steroid pada matrik keloid. Disamping itu akan dapat terjadi juga pecahnya jaringan serta *Cushingoid* ringan, sehingga dianjurkan pengobatan kombinasi krioterapi dan TA intralesi, yang diikuti dengan eksisi beberapa tahun kemudian dengan hasil yang memuaskan²⁸. Ketiga adalah imunoterapi. Dalam suatu penelitian, 29 penderita keloid yang didesensitasi dengan antigen sebum sebelum operasi, hanya 1/3 dari penderita tersebut yang mengalami kekambuhan. Disimpulkan, desensitasi dengan antigen sebum sebelum operasi, merupakan salah satu pengobatan alternatif pada penderita keloid.¹³ Keempat adalah pengobatan radiasi.^{13,16} Pemberian sinar X superfisial dengan dosis 1500-2000 rad sebelum 24 jam setelah operasi, atau penanaman Iridium¹⁹² pada saat luka ditutup, dilaporkan memberikan hasil yang cukup memuaskan, dengan angka kekambuhan berkisar antara 20-30%.⁸ Teknik-teknik ini dapat menimbulkan atrofi dan teleangiektasis, terutama bila diberikan dosis yang lebih besar. Kelima adalah pengobatan bebat tekan. Bebat tekan selama 6-12 minggu

setelah operasi keloid, terutama pada revisi keloid dengan tehnik flap dan Z plasti , terbukti menurunkan kekambuhan keloid.⁸ Bebat tekan tersebut dapat diganti dengan pemijatan kulit keloid dengan menggunakan krem kortikosteroid.⁸ Keenam adalah dengan menggunakan bedah laser.^{6,16-7} Penyinaran laser CO₂, dikombinasikan dengan suntikan TA pada tepi keloid, dilaporkan memberikan hasil yang baik, meskipun kekambuhannya masih harus diamati lebih lanjut.⁸ Pengobatan lain misalnya bedah beku, kemoterapi dengan Metotreksat maupun 5FU.^{10,12-5,18}

B. KOLAGEN

B.1. Macam dan susunan kolagen.

Kolagen adalah protein yang merupakan komponen utama serabut-serabut jaringan ikat. Pada tubuh manusia, serabut kolagen merupakan komponen terbesar dari matrik ekstraseluler, dan beratnya lebih dari 70% berat kering dermis. Dengan mikroskop elektron tampak bahwa kolagen tersusun oleh fibril dan miofibril atau tropokolagen, yang membentuk berkas pita-pita bersilangan.²⁹

Kolagen tipe I, yang merupakan purwarupa (prototipe) kolagen, adalah kolagen terbanyak di dermis dan jaringan ikat lain.²⁹ Membentuk 80-85% kolagen dermal total.³⁰ Tersusun dari 3 rantai polipeptida yang teranyam membentuk untaian rangkap tiga (*tiga helix*), dan masing-masing rantai mempunyai berat molekul sekitar 94.000 Dalton. Ketiga rantai polipeptida ini disebut juga rantai α yang tersusun oleh lebih dari 1000 macam asam amino. Sepertiganya merupakan asam amino glisin. Glisin selalu terletak pada posisi ke 3, sehingga rumusan rantai α dapat ditulis sebagai : (X-Y-Gli)₃₃₃ . Posisi X dan Y dapat diisi oleh sembarang asam amino, tetapi yang sering posisi X diisi oleh prolin dan Y diisi oleh hidroksiprolin.

Posisi X kadang-kadang diisi oleh lisin dan posisi Y diisi oleh hidroksilisin.²⁹⁻³¹

Asam amino lisin dan hidroksilisin dalam rantai α berguna untuk pembentukan untaian rangkap tiga, serta menjaga kestabilan rantai α melalui ikatan kovalen.³²

Hidroksiprolin berguna untuk mempertahankan kestabilan untaian rangkap tiga pada temperatur fisiologis.²⁹ Rantai ini dibagi menjadi rantai $\alpha 1$ dan rantai $\alpha 2$ berdasarkan komposisi asam amino penyusun rantai α ²⁹⁻³¹

Kolagen tipe III, merupakan bentuk kolagen yang berbeda secara genetik, terutama dijumpai pada jaringan saluran cerna dan pembuluh darah, berjumlah hampir 10% dari kolagen total pada dermis manusia dewasa. Pada awalnya disebut sebagai kolagen “fetus” karena terutama dijumpai pada kulit manusia selama fase embrionik. Namun, proliferasi fibroblas tipe I meningkat selama periode pasca kelahiran awal sampai rasio kolagen tipe I:III pada kulit manusia dewasa adalah 8:1. Kolagen tipe III terdiri dari 3 rantai α , $\alpha 1(III)$, dibedakan dengan rantai kolagen tipe I karena kandungan hidroksiprolin dan glisin yang relatif lebih tinggi dan adanya sisa sistein.²⁹

Kolagen dalam jaringan berdasarkan arsitektur serabutnya dibagi menjadi beberapa tipe yang secara genetis berbeda.²⁹

Tabel tipe kolagen berdasar pada arsitektur serabut kolagen dalam jaringan

Tipe kolagen	Komposisi rantai	Ciri khas molekuler	Distribusi jaringan
I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Fibrilar	Kulit, tulang, tendon
I-trimer	$[\alpha 1(I)]_3$	Fibrilar	Tumor, kulit
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrilar	Kartilago
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrilar	Kulit fetus, pembuluh darah, saluran cerna

III	$[\alpha 1(\text{III})]_3$	Fibrilar	Kulit fetus, pembuluh darah, saluran cerna
IV	$[\alpha](\text{IV})_2 \alpha 2(\text{IV})$	Membran basalis	Dimana-mana
V	$[\alpha 1(\text{V})_2 \alpha 2(\text{V}); [\alpha 1(\text{V})]_3$	Fibrilar	Dimana-mana
VI	$\alpha 1(\text{VI}) \alpha 2(\text{VI}) \alpha 3(\text{VI})$	Mikrofibril	Dimana-mana
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	<i>Anchoring fibril</i>	Papila dermis kulit dan jaringan epitel lain (sal.cerna, esofagus)
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_3$	<i>Network forming</i>	Sel endotelial
IX	$\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$	FACIT	Kartilago
X	$[\alpha 1(\text{X})]_3$	<i>Network forming</i>	Kartilago hipertrofik
XI	$\alpha 1(\text{XI}) \alpha 2(\text{XI}) \alpha 3(\text{XI})$	Fibrilar	Kartilago
XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	FACIT	Tendon, ligamentum, perikondrium, periosteum, kornea
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	Transmembran	Dimana-mana termasuk epidermis (dikenal 17 kombinasi)
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	FACIT	Kulit, tendon, kornea
XV	tidak diketahui	Membran basalis	Dimana-mana
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	FACIT	Kulit, organ dalam, kartilago
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	Transmembran	Hemidesmosom keratinosit basal di <i>dermal-epidermal junction</i> kulit
XVIII	tidak diketahui	Membran basalis	Dimana-mana
XIX	tidak diketahui	FACIT	Membran basalis
XX	tidak diketahui	FACIT	Epitel kornea, kulit embrionik, kartilago sternum, tendon, paru-paru
XXI	tidak diketahui	FACIT	Sel otot polos di dinding pembuluh darah, membentuk jantung

Diambil dari kepustakaan 29

Sintesis kolagen terutama dilakukan oleh fibroblas. Fibroblas menjadi aktif dan bergerak ke arah rongga perlukaan, diduga diakibatkan oleh rangsangan beberapa faktor, seperti : *Fibroblast Growth Factor* dan *Chemoattractant*, yang terbentuk ketika terjadi perlukaan.²⁷ Secara in vitro, faktor-faktor di atas dihasilkan oleh trombosit. Selama ada *Fibroblast Growth Factor*, *Epidermal Growth Factors* tidak dapat menempel pada reseptornya, sehingga proliferasi epidermis berjalan sangat lambat selama rongga luka belum terisi penuh oleh kolagen.^{27,33}

Berdasarkan pada sifat kolagen yang tidak larut dalam air, dapat dipastikan bahwa kolagen tidak langsung disintesis dalam bentuk jadi di dalam sel fibroblas. Penelitian lebih lanjut membuktikan bahwa kolagen disintesis dalam retikulum endoplasmik kasar dalam bentuk prokolagen. Prokolagen disintesis dari prekusornya berupa pro rantai α yang disintesis dalam ribosom fibroblas.²⁹

Sintesis pro rantai α didasarkan pada urutan kode genetis dalam mRNA.²⁹ Dengan teknologi biomolekuler, diketahui bahwa urutan nukleotida dari gene kolagen dalam RNA yang disalin oleh mRNA, terdiri dari *exon* yaitu kodon yang menentukan urutan asam amino dalam kolagen, dan *intron* yang merupakan urutan basa non kodon yang tidak menentukan urutan asam amino. Masing-masing tipe kolagen disintesis dibawah pengaturan genetis oleh gena-gena yang berbeda, dan diketahui paling sedikit 36 gena yang berbeda yang mengatur urutan asam amino dalam pembentukan molekul kolagen.^{29,34} Rantai-rantai alfa ini berhubungan dengan sedikitnya 1 tipe kolagen yang berbeda yang ditandai dengan angka Romawi I sampai dengan XXI. Dengan rekayasa *DNA recombinant*, diketahui bahwa gena yang mengatur sintesis pro rantai alfa 2 kolagen tipe 1 terletak pada

kromosom 7, sedangkan untuk pro rantai α 1 kolagen tipe I terletak pada kromosom 17.²⁹

Pro rantai α disusun berdasarkan salinan cetakan dari mRNA, sehingga urutan asam amino dari rantai alfa (protokolagen) mengikuti *exon* dari DNA. Setelah pro rantai α terbentuk, polipeptida ini dikirim pada retikulum endoplasmik kasar untuk dibentuk menjadi rantai α dengan jalan memotong ujung pro rantai α yang masih membawa pesan genetik dengan bantuan enzim protease spesifik.²⁹

Setelah rantai α terbentuk, asam amino prolin dan lisin menempel pada rantai α , kemudian terjadi hidroksilasi oleh enzim prolil hidroksilase dan lisil hidroksilase, sehingga terbentuk hidroksiprolin dan hidroksilisin. Glikosilasi hidroksilisin oleh enzim glikosil transferase dan galaktosil transferase terjadi setelah hidroksilasi, berupa penempelan galaktose atau glikosilgalaktose pada hidroksilisin, sehingga terbentuk Glikosil-galakto-O-hidroksilisin. Glikosil-galakto-O-hidroksilisin merupakan bentuk hidroksilisin pada Y dari rantai alfa X-Y-Gli.²⁹

Setiap rantai α mempunyai peptida pada akhir rantai yang berperan dalam mengatur penjajaran 3 rantai α , sehingga terbentuk molekul prokolagen yang berantai rangkap tiga. Peptida akhir rantai juga akan membuat molekul prokolagen yang larut dan mencegah terbentuknya kolagen fibril yang prematur, serta membuat prokolagen siap untuk dikeluarkan ke ruang ekstra seluler. Setelah prokolagen terbentuk, prokolagen dibawa ke golgi dalam bentuk vesikel-vesikel. Dari golgi, vesikel-vesikel tersebut akan disekresikan dengan pertolongan mikrotubuli dan mikrofilamen menuju ke permukaan sel, dan akhirnya berada di ruang ekstrasel.²⁹

Dalam ruangan ekstraseluler, peptida-peptida akhir dari prokolagen dipotong oleh prokolagen peptidase, sehingga terjadi tropokolagen. Tropokolagen ini tidak

larut serta menjadi fibril kolagen dan serabut kolagen.³² Daya regang kulit tidak akan terjadi bila ikatan silang melalui ikatan kovalen dalam serabut kolagen tidak ada.²⁹

Selama proses penyembuhan luka pada dermis, disintesis kolagen tipe I dan tipe III pada masa pembentukan jaringan granulasi. Kolagen tipe V disintesis selama masa pembentukan pembuluh darah dalam jaringan granulasi.²⁷

Adanya kolagen di dalam rongga luka, menyebabkan meningkatnya kekuatan tarikan luka, sehingga terjadi kontraksi luka dan akan menyebabkan *Epidermal Growth Factors* menempel pada reseptornya, sehingga terjadi peningkatan mitosis epidermis dan terjadi reepitelisasi.²⁷⁻³³

Pada pengecatan dengan Hematoksilin & Eosin, akan tampak gambaran serabut kolagen yang terpulas eosinofilik.^{30,35} Sedangkan tehnik imunoperoxidase digunakan untuk menunjukkan epitop kolagen tipe I, tipe III dan elastin.³⁰

B.3. Degradasi kolagen. Agar sintesis kolagen selama masa pembentukan jaringan parut tidak berlebihan, perusakan sisa kolagen harus dilakukan secara serempak. Perusakan kolagen tersebut dikenal sebagai proses degradasi kolagen.²⁷

Degradasi kolagen dilakukan oleh beberapa enzim, terutama dilakukan oleh kolagenase, karena protease-protease lain tidak mampu melakukan degradasi kolagen. Setelah denaturasi kolagen oleh kolagenase, enzim-enzim protease lainnya kemudian menghancurkan produk degradasi kolagen. Produk-produk dari degradasi kolagen, selain dapat dihancurkan oleh protease, juga dapat mengalami degradasi secara spontan.³⁶

Kolagenase dihasilkan oleh fibroblas, granulosit, makrofag, dan sel-sel epidermis dalam bentuk zimogen dan dalam jumlah kurang lebih 1% dari total

produksi protein ekstraseluler.²⁷ Perubahan zimogen menjadi enzim yang aktif dapat terjadi : pertama, bila ada proses pemecahan protein zimogen oleh enzim tripsin, sehingga zimogen kehilangan 10.000 dalton protein. Sisa zimogen tersebut dapat berikatan dengan serabut kolagen secara erat. Tripsin terbentuk selama proses peradangan. Kedua, zimogen dapat berubah menjadi kolagenase aktif secara spontan.³⁰ Ketiga, kolagenase ternyata dapat diaktifkan oleh mediator-mediator tertentu, seperti : enzim autolitik, enzim sitokinase, dan asam arakidonat.³⁷

Penghambatan aktivitas kolagenase pada tingkat seluler dilakukan oleh penghambat yang berasal dari jaringan yaitu TIMP (*Tissue inhibitors of metalloprotease*) yang dihasilkan oleh fibroblas, berupa Beta 1 antikolagenase. Antikolagenase lain dalam serum adalah : Faktor 4 pembeku darah, kortikosteroid melalui penekanan siklus AMP dan alfa 2 globulin.^{29,33}

Penelitian degradasi kolagen berdasar tipe kolagen, menyebutkan bahwa kolagen tipe 1 sampai dengan 3 sangat sensitif terhadap kolagenase, sedangkan kolagen tipe 4 sampai 5 relatif kebal terhadap kerja kolagenase. Kolagen tipe 4 dan tipe 5 dapat didegradasi oleh kolagenase apabila sebelumnya dilakukan denaturasi termal lebih dahulu.²⁹

C. BIAKAN FIBROBLAS

Saat ini, penelitian menggunakan kulit atau sel dari kulit yang diisolasi dari bagian tubuh telah menjadi prosedur rutin pada beberapa laboratorium. Kulit merupakan struktur yang kompleks terdiri dari beberapa tipe sel. Akhir-akhir ini, beberapa tipe sel yang berasal dari kulit manusia dapat dibiakkan di laboratorium; termasuk fibroblas, keratinosit, melanosit, dan sel endotel. Sejak Hayflicks

mempelopori penelitian menggunakan fibroblas manusia pada tahun 1960, sejak itu pula fibroblas diterima secara luas sebagai sistem model invitro untuk penelitian gerontologi berdasarkan *lifespan* nya pada biakan yang terbatas dan sifatnya selama penanaman dapat dianggap sama dengan penuaan pada tingkat makroskopik.³⁸ Untuk penelitian ini fibroblas merupakan model yang paling baik, karena disamping memiliki perangkat genetik (DNA) yang menjadi target penelitian, juga mudah dan stabil dalam biakan, serta memiliki *life span* yang panjang.³⁹

Untuk melihat mutasi secara in vitro diperlukan sel yang mempunyai perangkat genetis sebagai model. Sel yang diperoleh secara langsung dari penderita dan tumbuh pada medium biakan disebut sebagai biakan primer. Penggunaan koloni keratinosit ternyata mempunyai keterbatasan karena kemampuan pertumbuhannya yang sangat kurang, kecuali dengan penambahan *epidermal growth factor* dan *cholera toxin* yang dapat meningkatkan *life span* keratinosit pada biakan. Berbeda dengan keratinosit, fibroblas biasanya mudah tumbuh pada biakan serta dapat dilakukan subkultur dengan memindahkan fibroblas murni dari piring petri biakan jaringan primer, dipisahkan dan dimasukkan dalam medium segar, kemudian ditempatkan dalam piring petri baru untuk memulai pertumbuhan lagi.²⁶ Sel untuk penelitian biasanya dipelihara di dalam medium biakan cair yang mengandung garam organik, vitamin, asam amino, sumber energi (paling sering glukose), bufer (bikarbonat) untuk menjaga kestabilan pH pada 7,4 dan serum. Kemudian dijaga selalu pada temperatur 37°C dan untuk pertumbuhan optimal memerlukan 5% CO₂. Ada berbagai macam medium biakan jaringan tersedia saat ini. Media yang paling sering digunakan untuk transport dan pembiakan fibroblas adalah *DMEM* (*Dulbecco's Minimal Essential Medium*). Biasanya ditambahkan Penisilin dan

Streptomisin, serta *Fetal Bovine Serum* (FBS) atau *Fetal Calf Serum* (FCS). Kondisi-kondisi pada biakan seperti lamanya inkubasi, suplemen pada medium, bergantung pada tujuan dan pengalaman peneliti.³⁹

D. FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE

Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL) adalah model kontraksi luka secara invitro.⁴⁰⁻¹ Percobaan FPCL digunakan untuk mempelajari fibroblas dari matrik ekstraseluler. Pada FPCL, fibroblas berada dalam matrik kolagen secara tiga dimensional dimana dengan berjalannya waktu fibroblas akan berkontraksi bersama-sama serabut kolagen. Kemampuan fibroblas untuk melakukan reorganisasi matrik ekstra seluler dicatat melalui pengukuran daerah "collagen lattice" secara serial dengan *Scion Image*.²²

Pada percobaan dengan 5FU, FPCL fibroblas manusia normal akan berkontraksi dengan pola yang mirip FPCL fibroblas keloid. Terdapat penghambatan kontraksi FPCL yang tergantung dosis obat yang diberikan Sedangkan kontrol yang tidak mengandung sel tidak mengalami kontraksi.^{22,48} Sehingga disimpulkan bahwa kontraksi FPCL disebabkan interaksi antara fibroblas dan serabut kolagen di sekitarnya.^{22,42}

Jumlah fibroblas dalam gel mempengaruhi kontraksi FPCL dan ketebalannya. *Lattice* menjadi lebih tebal sesuai bertambahnya waktu dan penebalan ini berbanding lurus dengan jumlah sel. Sebaliknya tidak ada hubungan antara konsentrasi kolagen dan ketebalannya. Shister dkk menemukan bahwa terdapat hubungan langsung antara kolagen kulit dan ketebalan dermis walaupun ketebalan kulit sendiri tidak dapat digunakan untuk mengukur kandungan kolagen kulit.⁴⁰

E. AGYROPHYLIC NUCLEOLAR ORGANIZER REGION

Untuk mengukur aktivitas proliferasi sel dipakai pengecatan *AgNOR* (*Agyrophylic Nucleolar Organizer Region*). Teknik ini telah dikembangkan dan dipelajari secara intensif oleh Crocker dkk pada 1989.⁴³ *Nucleolar organizer regions (NOR)* adalah lengkung DNA ribosomal yang menempati area khusus pada kromosom 13,14,15,21 dan 22 yang diketahui sebagai tempat gena DNA ribosomal (rDNA). *NOR* mempunyai struktur nukleoprotein khas yang selama transkripsi bersifat asidik sehingga dapat diwarnai dengan perak. Dengan pewarnaan tersebut *AgNOR* dapat dilihat dengan mikroskop cahaya sebagai bintik-bintik hitam pada nukleus. Pengukuran indek proliferasi fibroblas dilakukan dengan menghitung rerata bintik hitam dalam seratus nukleus fibroblas. Jumlah dan ukuran berhubungan dengan aktivitas inti dan menunjukkan aktivitas proliferasi sel⁴⁴

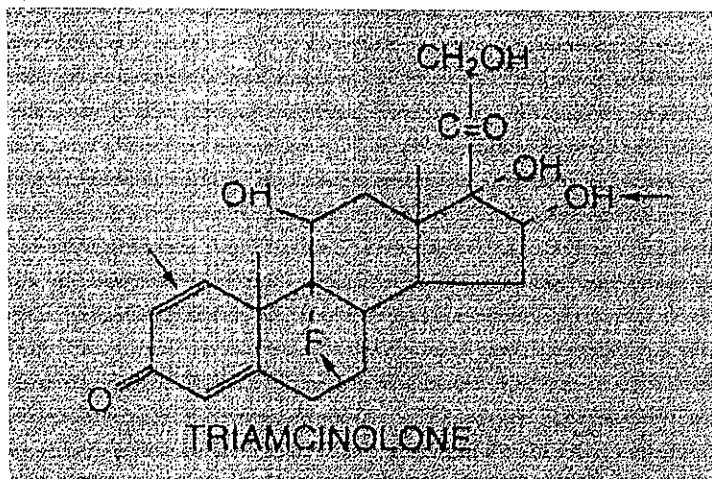
Dalam bidang dermatologi kegunaan teknik *AgNOR* telah dievaluasi dalam membedakan nevus displastik dan melanoma. Kesimpulan dari penelitian tersebut adalah nilai *AgNOR* dapat dipakai sebagai alat tambahan untuk membedakan melanoma dan *borderline melanocytic naevi*.⁴⁵ Disamping itu kuantitas *AgNOR* juga mempunyai arti prognostik untuk melanoma maligna. Nilai *AgNOR* juga dapat dipakai sebagai penanda untuk menilai aktivitas fibroblas pada keloid dan parut hipertrofik.⁴⁶

Penggunaan teknik pengecatan *AgNOR* untuk menilai efek antiproliferasi TA dan 5FU belum pernah dilaporkan. Secara teoritis teknik ini dapat memiliki arti dalam menilai tingkat penekanan proliferasi oleh TA dan 5FU.

F. TRIAMCINOLON ASETONID

Triamsinolon asetonid (TA) merupakan bubuk kristal berwarna putih atau “cream”, hampir tidak berbau yang bersifat : larut dalam air, sebagian larut dalam alkohol dan kloroform, sangat sedikit larut dalam ether dengan berat molekul : 434,5.⁴⁷

TA mempunyai rumus kimia : 9 α -Fluoro-11 β , 21-dihidroksi-16 α , 17 α -isopropilidenediaksipregna-1, 4-diene-3, 21-dione atau C₂₄ H₃₁ FO₆ dengan struktur kimia.⁴⁸ :



Para ahli menduga, TA bekerja pada keloid dengan cara menghambat sintesis protein, proliferasi fibroblas , migrasi fibroblas serta aktivitas makrofag. TA dapat menghambat inhibitor enzim *α -globulin kolagenase* sehingga akan meningkatkan degradasi kolagen ,mengurangi inflamasi, antagonis terhadap kerja *Transforming Growth Factor- β* (*TGF- β*) suatu stimulator kolagen dan protein matrix ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblas, juga menstimulasi produksi *basic Fibroblast Growth Factor* (*bFGF*).^{10,13,47,49}

Dosis *invivo* TA antara 10-40 mg/ml diberikan tiap 2-4 minggu selama 3-4 bulan, tergantung respon pengobatan. Interval injeksi dapat diperpanjang bertahap menjadi setiap 2,3,4 atau 6 bulan.^{8-10,18}

Pada percobaan oleh Cruz dan Korchin secara *invitro*, TA dosis 10 μ m dapat menghambat pertumbuhan fibroblas keloid dan fetus secara bermakna. Sedangkan pada percobaan oleh Carroll dkk, TA dosis 20 μ m menyebabkan peningkatan nilai TGF- β 1 pada fibroblas normal dan keloid. Pada fibroblas keloid, dosis TA 10 μ m juga menyebabkan penurunan nilai TGF- β 1 yang bermakna secara statistik.⁵⁰

Sediaan TA yang ada di pasaran 10 mg/cc dan 40 mg/cc (*Kenacort A IA/ID*, *Bristol-Myers Squibb*).

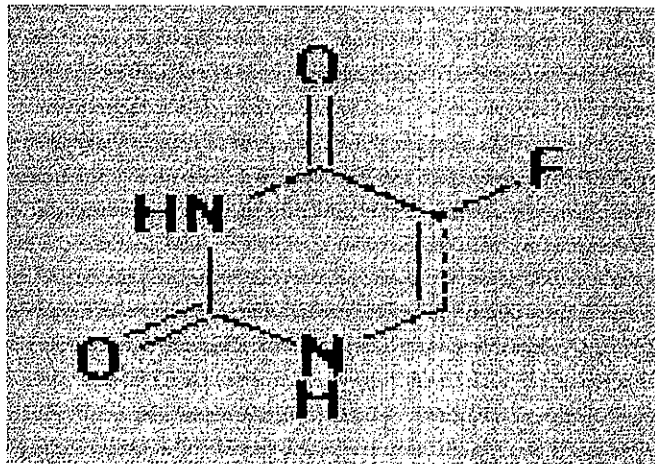
Efek samping TA antara lain: rasa nyeri pada lokasi injeksi, munculnya sindrom *Cushing*, hipopigmentasi di sekitar injeksi dan atrofi kulit sekitarnya jika obat tidak diinjeksikan secara tepat ke dalam skar, teleangiektasis, syok neurogenik dan perdarahan. Sebagian besar efek samping berhubungan dengan dosis akumulatif yang diberikan.^{8,10,16-21,51} TA sering diberikan secara kombinasi dengan bedah eksisi maupun bedah beku.^{8,9}

G. 5 FLUOROURASIL

5 Fluorourasil disebut juga Fluorourasil, 5FU, 5-fluoro-2,4(1H,3H)-pirimidinedion dengan berat molekul : 130,1.⁵²

5FU merupakan obat anti kanker (kemoterapi anti proliferasi) yang bekerja dengan cara berinteraksi dengan pertumbuhan sel-sel kanker dan memperlambat pertumbuhan dan penyebarannya dalam tubuh.^{15,22}

Rumus kimia 5FU adalah $C_4H_3FN_2O_2$ ⁵³



Mekanisme kerja 5FU pada keloid dengan mencegah reorganisasi matrik ekstraseluler serta menghambat kontraksi *Fibroblast Populated Collagen Lattice* (FPCL). 5FU dosis rendah diduga akan menghambat proliferasi fibroblas.²²

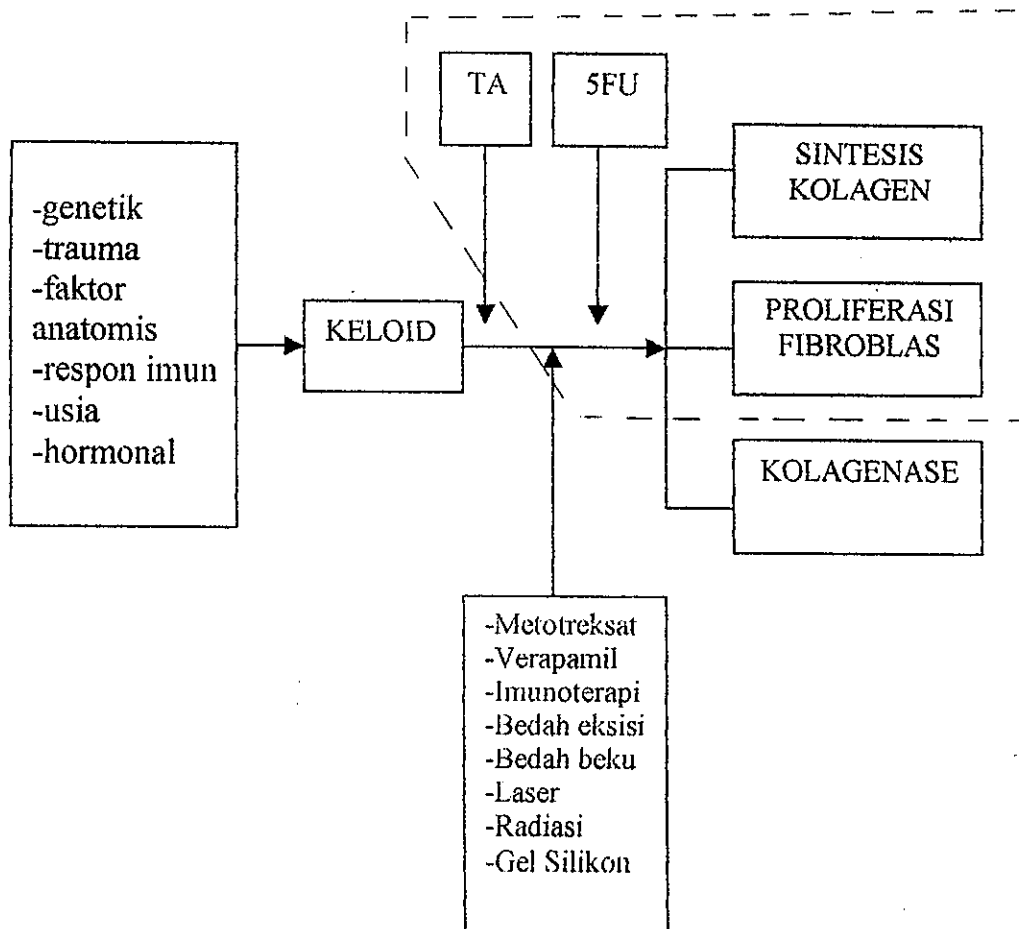
Dosis *invivo* 5FU pada pengobatan keloid, diberikan secara intralesi dengan dosis 50 mg/ml setiap minggu selama 12 minggu dan dimonitoring setelah 24 minggu.^{14,15}

Pada kultur fibroblas keloid dan normal, dosis 5FU 0,1 mg/cc hanya sedikit menghambat proliferasi fibroblas. Dosis 1,0 mg/cc dan 10 mg/cc dapat menghambat proliferasi sel dengan baik tanpa menyebabkan sitolisis.²²

Sediaan 5FU yang ada : 250 mg/cc dan 500 mg/cc (*5FU DBL, Tempo Scan Pasific*)

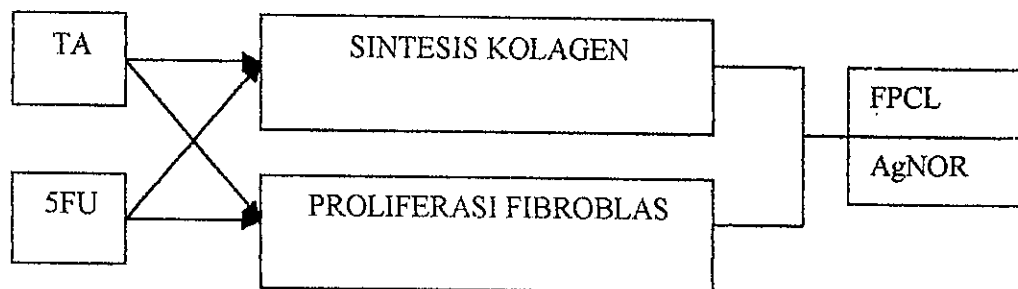
Efek samping 5FU antara lain: nyeri di daerah injeksi, rasa terbakar, reaksi alergi (kesulitan bernafas), penurunan fungsi sumsum tulang dan masalah darah (kelelahan yang berlebihan, mudah memar atau berdarah, berak darah, demam atau menggigil, tanda infeksi), embriotoksik, teratogenik, saluran kencing, saluran cerna (mual berat atau diare), luka di mulut atau tenggorokan; dan lain-lain.^{14,52-3}

H. KERANGKA TEORI



Penelitian ini dilakukan secara invitro pada biakan fibroblas jaringan keloid dengan menggunakan TA dan 5FU untuk mencari kombinasi dosis optimal yang dapat menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas dengan kontraksi *FPCL* dan *AgNOR*, sehingga faktor-faktor lain tidak dibahas.

I. KERANGKA KONSEP



J. HIPOTESIS

Berdasarkan landasan teori di atas disusun hipotesis sebagai berikut :

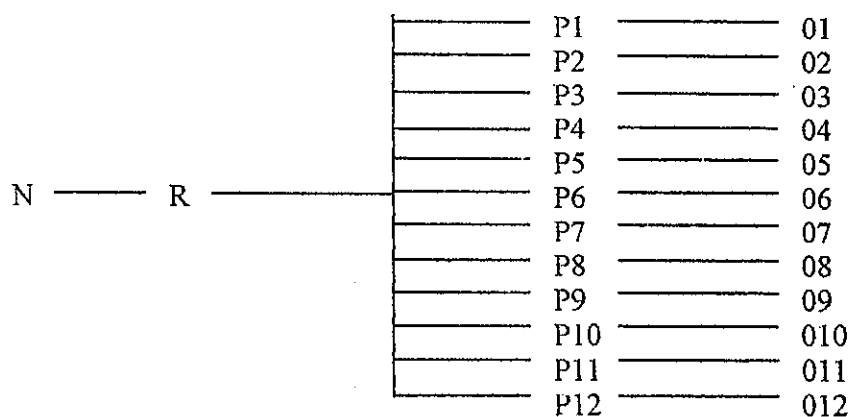
1. Ada perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari kombinasi TA dan 5FU dibanding yang dipapari TA atau 5FU saja atau yang tidak dipapari TA atau 5FU.

BAB III

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian menggunakan rancangan penelitian eksperimental laboratorik dengan pendekatan *Post test-only Control Group Design* yang menggunakan kultur sel dalam sumuran sebagai unit penelitian. Perlakuan adalah pemberian TA dan 5FU pada *FPCL* dan biakan fibroblas jaringan keloid kulit manusia yang diambil dari 1 keloid donor dengan keluaran perubahan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas.



Keterangan :

R : Randomisasi

P1 : *FPCL* dan *AgNOR* yang tidak dipapari TA maupun 5FU, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA-5FU-

P2 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari 5FU 0,1 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA-5FU0,1

P3 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari 5FU 1 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA-5FU1

- P4 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari 5FU 10 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA-5FU10
- P5 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 10 η m, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA10 5FU-
- P6 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 10 η m dan 5FU 0,1 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA10 5FU0,1
- P7 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 10 η m dan 5FU 1 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA10 5FU1.
- P8 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 10 η m dan 5FU 10 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA10 5FU10.
- P9 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 20 η m , selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA20 5FU-
- P10 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 20 η m dan 5FU 0,1 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA205FU0,1.
- P11 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 20 η m dan 5FU 1,0 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA20 5FU1.
- P12 : *FPCL* dan *AgNOR* yang dipapari TA 20 η m dan 5FU 10 mg/ml, selanjutnya disebut Kelompok Perlakuan TA20 5FU10.

- 01 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P1
- 02 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P2

- 03 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P3
- 04 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P4
- 05 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P5
- 06 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P6
- 07 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P7
- 08 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P8
- 09 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P9
- 010 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P10
- 011 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P11
- 012 : Pengamatan hambatan kontraksi *FPCL* dan jumlah *NOR* pada kelompok perlakuan P12

Masing-masing perlakuan dilakukan secara triplo dan diambil nilai rerata.

UPT-PUSTAK-INDIP

B. POPULASI DAN SAMPEL

Populasi penelitian ini adalah kultur fibroblas jaringan keloid yang dibiakkan dalam medium *DMEM* yang mengandung *FBS* 10%, Fungizone 0,1%, Gentamisin 0,2% (medium *DMEM* lengkap), yang dipanen dari kultur fibroblas dalam *flask* dan dilakukan penghitungan proliferasi fibroblas. Pada perlakuan dengan *FPCL* ditempatkan secara acak sederhana ke dalam 36 sumuran dalam jumlah yang sama persumurannya yaitu 0,5 cc persumuran. Sumuran pertama sampai dengan tiga dipapari medium *DMEM* lengkap, sumuran keempat sampai dengan enam dipapari 5FU 0,1 mg/ml, sumuran ketujuh sampai dengan sembilan dipapari 5FU 1 mg/ml, sumuran kesepuluh sampai dengan duabelas dipapari 5FU 10 mg/ml, dan seterusnya sampai sumuran ke tiga puluh enam. Setelah inkubasi 2 jam, masing-masing sumuran dicuci dari mediumnya yang mengandung TA atau 5FU, kemudian diamati kontraksi *FPCL* pada 24 jam.

Pada perlakuan dengan *AgNOR*, ditetaskan sel pada 36 *cover glass* dengan jumlah yang sama yaitu 200 μ l kemudian diberikan perlakuan dengan TA dan 5FU, dicat dengan *AgNOR* dan dinilai indeks proliferasinya.

C. VARIABEL PENELITIAN

C.1. Variabel bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah : perlakuan dengan kombinasi berbagai dosis, yang dapat dikategorikan menjadi 12 kelompok perlakuan sesuai dengan kelompok sampel.

C.2. Variabel tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah : proliferasi fibroblas dan sintesis kolagen yang diukur dengan *FPCL* dan *AgNOR*

D. BAHAN PENELITIAN

- Keloid dari penderita yang diambil di poli Kulit dan Kelamin RS Dr.Sardjito.
- Kultur fibroblas jaringan keloid
- TA
- 5FU
- Alkohol 70%
- Medium kultur *DMEM*
- Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase* (Sigma Chemical Co)
- Fetal Calf serum* (FCS)
- Human serum
- Antibiotik penisilin-streptomisin, gentamisin
- Fungizone, hepes (*N-2 hyrdoxyethylpiperazin n-2-ethanesulfonic acid*)
- Phosphate buffered saline* (PBS)
- Tripsin/etilendiamintetraasetik asid (*EDTA*)
- Larutan *Turk*
- Kolagen (dari buntut tikus)
- Natrium hidroksida (NaOH)
- Natrium bikarbonat (NaHCO₃)
- Cat perak nitrat

E. ALAT PENELITIAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah :

1. Sarung tangan steril
2. Masker
3. Bak tahan karat (stainless) ukuran tanggung yag sudah disterilkan
4. Gunting steril
5. Pinset bedah steril yang ujungnya steril
6. Tabung kultur Falcon (*Falcon Flask Culture*) ukuran 50 ml.
7. Rak tabung
8. Piring petri steril
9. Lempeng biakan (plate) dengan 24 sumuran
10. Skalpel no.15 dengan tangkainya
11. Pipet ukur 10 ml, 5 ml, pipet mikro, pipet transfer, pipet pasteur steril
12. Inkubator CO2
13. *Yellow tip, blue tip, white tip*
14. Botol *Schoot Duran* tutup biru 100ml, 500ml
15. Ependof
16. *Laminar flow hood*
17. Tabung steril 15 cc/50cc
18. *Refrigerate centrifuge*
19. *Inverted microscope*
20. Kamera

F. TEMPAT DAN LAMA PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Universitas Gadjah Mada Yogyakarta selama kurang lebih 3 bulan.

G. DEFINISI OPERASIONAL

-Perlakuan

adalah pemberian TA dan 5FU dengan berbagai kombinasi dosis, dikategorikan menjadi 12 kelompok, dilakukan secara triplo :

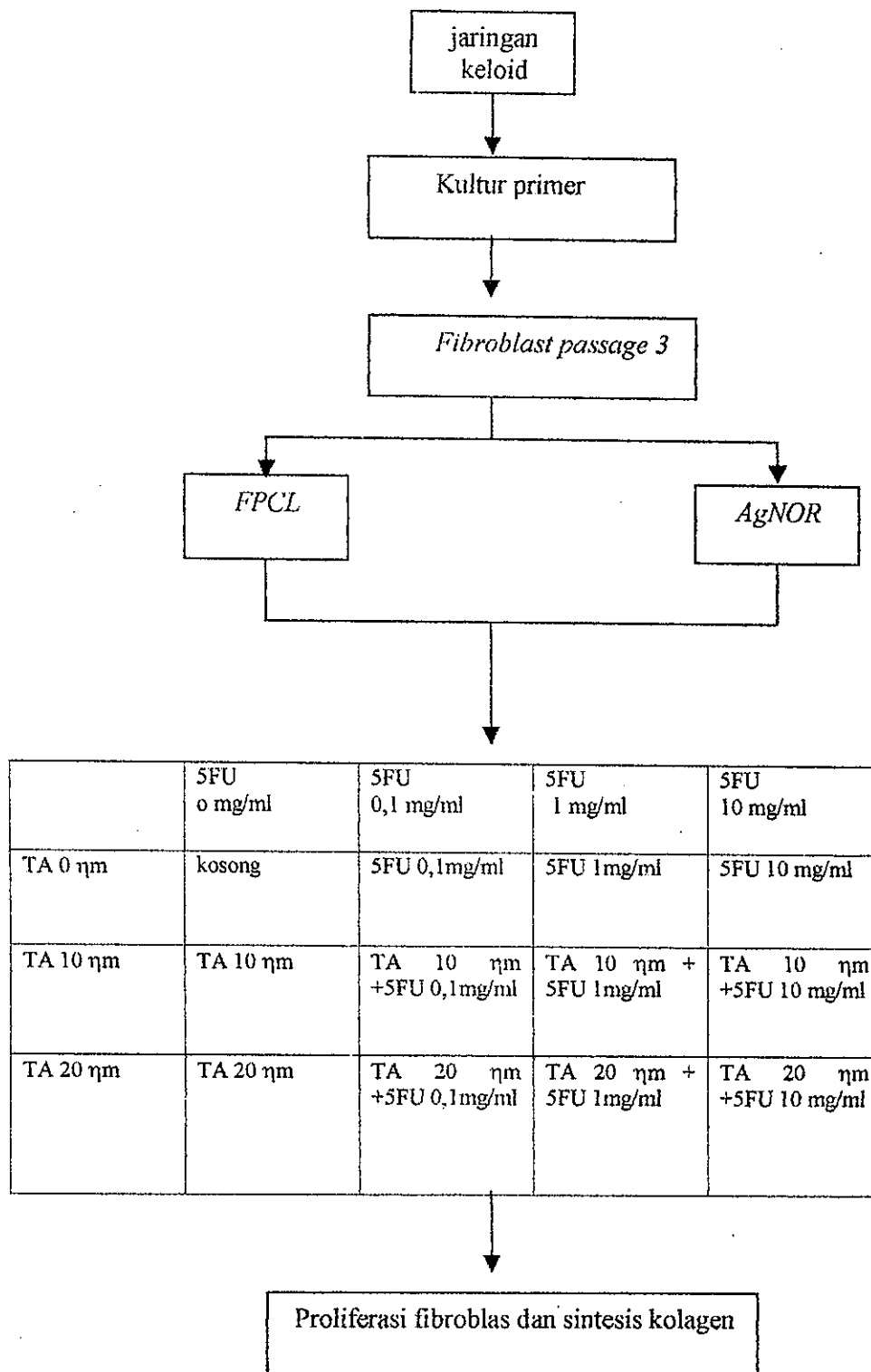
1. kosong (hanya diberi medium lengkap)
2. 5FU 0,1 mg/ml
3. 5FU 1 mg/ml
4. 5FU 10 mg/ml
5. TA 10 μ m
6. TA 10 μ m + 5FU 0,1 mg/ml
7. TA 10 μ m + 5FU 1 mg/ml
8. TA 10 μ m + 5FU 10 mg/ml
9. TA 20 μ m
10. TA 20 μ m + 5FU 0,1 mg/ml
11. TA 20 μ m + 5FU 1 mg/ml
12. TA 20 μ m + 5FU 10 mg/ml

-*AgNOR : Agyrophylic Nucleolar Organizer Region.*

Digunakan untuk mengukur indeks proliferasi fibroblas yaitu dengan menghitung rerata bintik hitam dalam seratus nukleus fibroblas. Jumlah dan ukuran berhubungan dengan aktivitas inti dan menunjukkan aktivitas proliferasi sel tumor (Indeks proliferasi)

-*FPCL : Fibroblast Populated Collagen Lattice*, yaitu model kontraksi luka secara invitro. Fibroblas berada dalam matrik kolagen secara tiga dimensional dimana dengan berjalannya waktu fibroblas akan berkontraksi bersama-sama serabut kolagen yang dinilai dengan *Scion Image*.

H. ALUR PENELITIAN



Penyiapan jaringan dari donor.

1. Pertama-tama disiapkan alat-alat : sarung tangan steril, masker, bak tahan karat, 3 buah pinset bedah, gunting, tabung reaksi 30 ml diisi medium *DMEM* 15 ml dengan antibiotik yang ditutup rapat, dan 5 buah tabung 15 ml diisi sebagai berikut :

Tabung I s/d III diisi *PBS* steril dengan antibiotik sekitar 10 ml pertabung, kemudian ditutup rapat secara steril. Tabung IV diisi alkohol 70 % 10 ml dan tabung V diisi *PBS* dengan antibiotik. Semua tabung didirikan pada rak tabung dengan urutan I-V.

5. Potongan keloid ditaruh di bak, dipilih jaringan yang paling segar, kemudian dipotong dengan ukuran 3 x 1 cm²
6. Dengan menggunakan pinset yang kedua, potongan jaringan dimasukkan dalam tabung I, dikocok sampai darahnya hilang. Dilakukan 3 kali sampai tabung III.
7. Jaringan dimasukkan dalam alkohol, pinset dibuang, kemudian dengan menggunakan pinset ke 3 jaringan tadi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung V, dicuci sekitar 30 detik.
8. Jaringan dimasukkan ke botol kontainer media.
9. Masukkan dalam termos es.

Semua prosedur dalam pengambilan jaringan dilakukan dalam keadaan steril.

Teknik kultur primer

1. Siapkan 2 buah piring petri steril, pinset bedah, gunting, skalpel no.15 dengan tangkainya, pipet 10 ml, tabung sentrifus 15 ml, tabung biakan *Falcon*, medium *DMEM* dengan *FBS* 20% dan antibiotik.

2. Piring petri dibasahi dengan *PBS* secukupnya, jaringan dicuci, dipindah ke petri ke 2.
2. Pada petri ke 2 kulit dipotong pada kedua sisinya sehingga didapatkan komponen dermis saja dan dicuci. Jaringan nekrotik dibuang dengan jalan *PBS* di petri disedot dan diganti yang baru. Jaringan dermis kemudian dipotong kecil-kecil dengan ukuran sekitar 0,5-1 mm. Jaringan tersebut disedot dengan pipet basah, masukkan dalam tabung sentrifus yang mengandung *PBS* dan biarkan mengendap.
3. Supernatan dibuang, masukkan *PBS* baru, biarkan lagi mengendap. Lakukan 2-3 kali.
4. Gunakan pipet basah (pipet yang sudah menyedot medium), kemudian potongan jaringan disedot satu satu dan dipindahkan ke dalam tabung biakan kira-kira 20-30 potong per tabung biakan 25 cm². Sebelumnya tabung biakan dibasahi dengan medium yang telah ditambah *FBS* 20% dan antibiotik.
5. Setelah jaringan tertata di tabung biakan, sedot sisa cairan dan tambahkan medium dengan *FBS* 20% dan antibiotik sebanyak 1 cc/25 cm².
6. Miringkan tabung biakan secara hati-hati untuk meratakan potongan jaringan di permukaan.
7. Tutup rapat, beri nama.
8. Masukkan dalam inkubator dengan temperatur 37⁰C dan CO₂ 5%, biarkan selama satu minggu.
9. Jika potongan sudah tampak melekat pada dasar tabung biakan, volume medium dinaikkan menjadi sekitar 4 cc dengan cara menyedot cairan lama kemudian ganti yang baru. Selanjutnya medium diganti 2-3 hari sekali atau segera bila tampak sudah menguning.

10. Fibroblas dibiarkan tumbuh sampai konfluen kemudian sel siap dipanen. Medium biakan disedot, tambahkan *PBS* untuk mencuci atau menghilangkan *FBS*, lakukan 2 kali. Sel kemudian dicuci dengan *EDTA* 0,02% atau dengan tripsin 0,25% selama 3-5 menit, diamkan kemudian digoyang dan disemprot-semprot. Kerja tripsin dihentikan dengan penambahan medium yang mengandung *FBS*, kemudian suspensi sel yang terjadi di pusingkan selama 5 menit pada 1000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan sel dibuat suspensi dalam 1000 μ l (1 cc) medium. Suspensi sel diambil 10 μ l dan ditambahkan *Turk* 90 μ l (dibuat pengenceran suspensi 10 kali) kemudian dihitung pada bilik hitung hemositometer dengan menggunakan mikroskop *inverted* pembesaran 100x.

11. Diambil suspensi fibroblas untuk dilakukan subkultur sebagai bahan dalam penelitian ini. Setiap subkultur sel fibroblas yang diambil dari biakan primer dibagi menjadi 6 kelompok. Pada masing-masing kelompok eksperimen dilakukan subkultur sebanyak 10^5 sel pada setiap sumuran lempeng dan sel dipelihara dengan medium yang diberi *FBS* 10%.

Percobaan dilakukan secara triplo.

FIBROBLAST POPULATED COLLAGEN LATTICE

-siapkan kolagen dari buntut tikus

-memanen fibroblas keloid

-Siapkan obat yang akan dipakai untuk perlakuan (dosis, pengenceran dengan *PBS*)

- Membuat *FPCL* (25 ml *FPCL*). Perinciannya :

- *DMEM* 3x : 6,66 ml
- *FCS* : 2,5 ml
- *NaOH* : 2,5 ml
- Kolagen : 7,5 ml
- *NaHCO₃* : 2 ml
- Sel : 0,5 ml

-Isi tiap sumuran 0,5 ml (harus kondisi dingin agar tidak membeku), inkubasi 2 jam

-Setelah kolagen padat (tidak goyang, terbentuk stelata pada mikroskop), beri perlakuan (obat yang akan diuji cobakan) goyang agar rata dan tidak mengendap.

-Inkubasi 2 jam

-Tambahkan *PBS* 200 μ l tiap sumuran, goyang sumuran, sedot *PBS* dari sumuran dengan hati-hati, jangan sampai *FPCL* tersedot. Diulang 2-3 kali.

-Inkubasi 24 jam

-Dinilai kontraksi *FPCL*

-Ukur dan foto pada 24 jam, kemudian dilepas dari sumuran dan ukur juga untuk perbandingan.

-Data foto dianalisa dengan komputer dengan *Scion Image*.

CARA MENGUKUR DENGAN *SCION IMAGE*

- Foto masing –masing sumuran dengan kamera digital dengan jarak dan sudut yang sama.

- Pindahkan data foto ke komputer dengan *Scion Image*.

- Ukur diameter kolagen batas terluar dalam sumuran (A)

- Ukur diameter kolagen batas terdalam dalam sumuran yang berkontraksi (B)
- Nilai hambatan kontraksi *FPCL* didapat dengan menghitung : $(A-B) : A$
- Makin banyak fibroblas hidup dalam *Collagen Lattice* maka makin besar nilai hambatan kontraksi *FPCL*.
- Pada sumuran yang tidak ditambahkan sel, tidak dijumpai hambatan kontraksi *FPCL*.

AgNOR

- Memanen sel
- Masukkan sel 100 μ l tiap dek glas sebanyak 36 sumuran (teteskan di tengah-tengah), inkubasi 1-2 jam
- Amati di bawah mikroskop sampai sel tampak menempel di dek glas, kemudian tambahkan *DMEM* lengkap 1 ml tiap sumuran.
- diamkan semalam
- DMEM* disedot dari dek glas, teteskan obat yang sudah dilarutkan dengan PBS , diamkan 2 jam
- PBS* disedot, buang
- Beri *DMEM* lengkap, amati selama 2 hari
- Fiksasi dengan metanol yang didinginkan dalam kulkas minimal 30 menit (harus cepat ditetaskan).Dilanjutkan pengecatan *AgNOR*.

PENGECATAN *AgNOR* :

- Metanol dibuang, cuci dengan air mengalir dengan hati-hati agar sel tidak hilang. keringkan dengan suhu ruangan (dibalik di atas kertas) .
- Buat larutan A:B = 2:1 dalam ruang gelap dan segera teteskan dalam dek glas, masing-masing 200-400 μ l , biarkan 45 menit.
- Buang cat, cuci dengan air mengalir, dibalik di kertas, tetesi alkohol.
- Dek glas dicukil, pasang di obyek glas yang sudah ditetesi balsem *Canadian* dan xylol
- Amati dengan mikroskop, hitung jumlah *NOR* dalam tiap inti, tiap sediaan hitung 100 sel untuk mendapatkan rata-ratanya. Bila terdapat struktur polisiklik besar (*NOR* saling tumpang tindih), maka dianggap *AgNOR* tunggal jika bintik-bintik individual tidak teridentifikasi.

H. ANALISIS DATA

Data hasil penelitian diolah dan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik. Data dari kelompok-kelompok perlakuan pada penelitian ini diasumsikan terdistribusi dengan normal, sehingga dilakukan analisis parametrik uji ANOVA dan *independent t test* untuk melihat perbedaan pada kelompok-kelompok perlakuan. Besarnya perbedaan masing-masing kelompok perlakuan dianalisis lebih lanjut dengan uji *Post Hoc Tukey* oleh karena varian datanya homogen. Semua analisis statistik dilakukan dengan menggunakan program komputer *SPSS 10.01 for Windows*. Nilai signifikansi penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p < 0,05$.

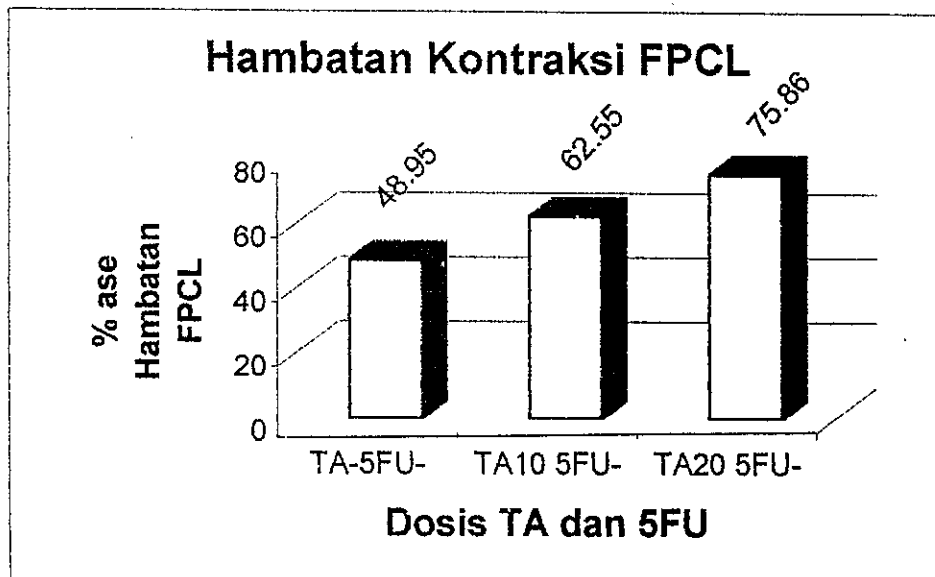
I. KESULITAN PENELITIAN

Kurangnya pengalaman peneliti sehingga meningkatkan risiko kematian sel.

Kultur dari jaringan keloid donor harus dipelihara dengan hati-hati untuk mencegah kontaminan. Jika terjadi kontaminan harus segera dilakukan dekontaminasi dengan dicuci medium yang mengandung fungizone dan antibiotik serta dipelihara dalam medium yang mengandung fungizone, antibiotik serta *FBS* 20%.

BAB IV. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

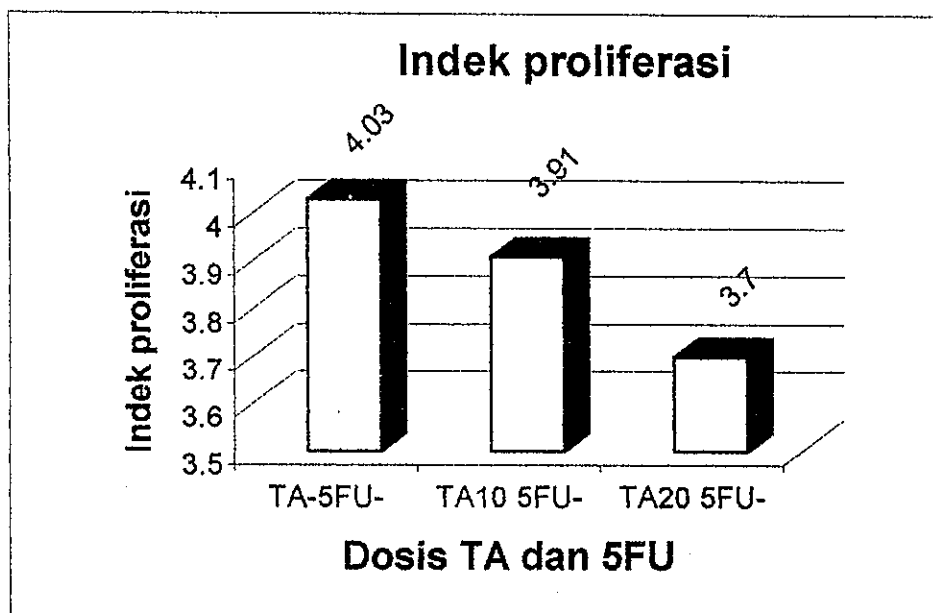
Penelitian ini menggunakan jaringan keloid dari 1 penderita. Kemudian dilakukan kultur fibroblas dan diberikan perlakuan pada *passage* 3. Penelitian dilakukan selama 3 bulan dari bulan Juni 2004 - Agustus 2004.



Grafik 1. Hambatan Kontraksi *FPCL* terhadap berbagai dosis TA

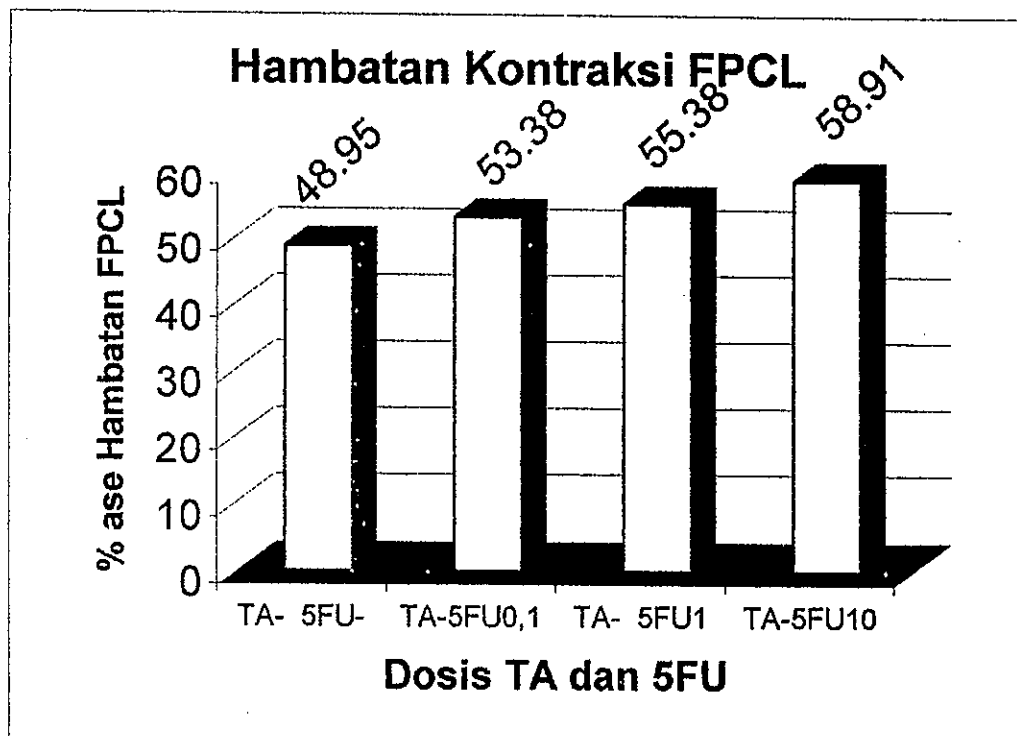
Grafik 1 menunjukkan prosentase hambatan kontraksi *FPCL* terhadap berbagai dosis TA yang berbeda akan memberikan efek yang berbeda. Tampak bahwa pada kontrol (tanpa TA maupun 5FU) hambatan kontraksi *FPCL* paling kecil (48,95%), sedangkan pada pemberian dosis TA 10nm memberikan hambatan *FPCL* yang lebih besar (62,55%) disusul TA 20nm. Uji *ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan hambatan kontraksi *FPCL* yang bermakna pada ketiga kelompok perlakuan ($p=0,000$). Sedangkan pada uji *Tukey HSD* menunjukkan perbedaan

hambatan kontraksi *FPCL* yang bermakna antara kelompok kontrol dibandingkan kelompok TA10 5FU- ($p=0,000$) dan kelompok TA20 5FU- ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa makin tinggi dosis TA yang diberikan makin besar hambatan *FPCL* yang terjadi, dimana pada penelitian ini dosis TA 20 μM memberi hambatan *FPCL* tertinggi. Ini sesuai dengan efek TA yaitu dapat menghambat inhibitor enzim α -globulin kolagenase sehingga akan meningkatkan degradasi kolagen, mengurangi inflamasi, antagonis terhadap kerja *Transforming Growth Factor- β* (*TGF- β*) suatu stimulator kolagen dan protein matrix ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblas, juga menstimulasi produksi *basic Fibroblast Growth Factor* (*bFGF*).^{10,13,47,49} sehingga menyebabkan penghambatan kontraksi *FPCL*.



Grafik 2. Indek Proliferasi terhadap berbagai dosis TA

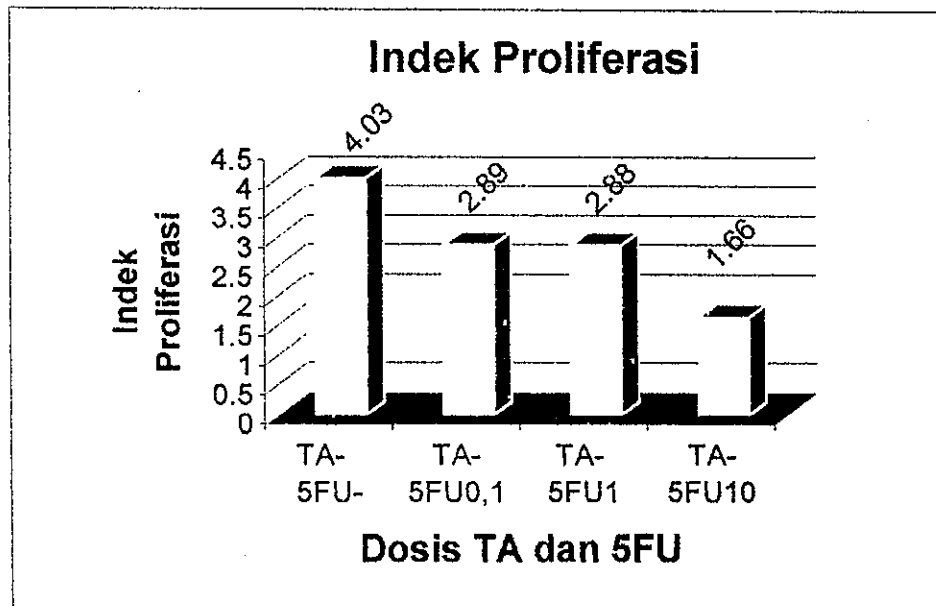
Grafik 2 menunjukkan indeks proliferasi fibroblas terhadap berbagai dosis TA yang berbeda. Tampak bahwa indeks proliferasi fibroblas paling kecil pada pemberian TA dosis 20 η m (3,70) dibandingkan TA 10 η m yaitu sebesar 3,91 maupun kontrol yaitu 4,03. Dengan uji *ANOVA* tampak bahwa perbedaan indeks proliferasi antara ketiga kelompok perlakuan tidak ada perbedaan yang bermakna ($p=0,710$). Dengan uji *Tukey HSD* antara kelompok kontrol dengan kelompok TA10 5FU- tidak didapatkan perbedaan indeks proliferasi yang bermakna ($p=0,950$) juga antara kelompok kontrol dan TA20 5FU (0,694), sedangkan dengan penambahan dosis TA tidak memberikan perbedaan indeks proliferasi yang bermakna secara statistik. Pada percobaan oleh Cruz dan Korchin secara invitro, TA dosis 10 η m dapat menghambat pertumbuhan fibroblas keloid dan fetus secara bermakna. Sedangkan pada percobaan oleh Carroll dkk, TA dosis 20 η m menyebabkan peningkatan nilai TGF- β 1 pada fibroblas normal dan keloid. Pada fibroblas keloid, dosis TA 10 η m juga menyebabkan penurunan nilai TGF- β 1 yang bermakna secara statistik.⁵⁰



Grafik 3. Hambatan Kontraksi *FPCL* terhadap berbagai dosis 5FU

Grafik 3 menunjukkan prosentase hambatan kontraksi *FPCL* terhadap berbagai dosis 5FU yang berbeda. Tampak bahwa peningkatan dosis 5FU diikuti peningkatan hambatan kontraksi *FPCL* pada seluruh kelompok perlakuan. Hambatan kontraksi *FPCL* tertinggi tampak pada kelompok perlakuan TA-5FU10. Uji *ANOVA* terhadap keempat kelompok perlakuan menunjukkan perbedaan hambatan kontraksi *FPCL* yang bermakna ($p=0,000$). Pada uji *Tukey HSD* menunjukkan bahwa peningkatan hambatan kontraksi *FPCL* pada pemaparan 5FU dosis 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, dan 10 mg/ml menunjukkan perbedaan yang bermakna dibandingkan kontrol ($p=0,000$). Hal ini disebabkan karena efek 5FU dalam menghambat proliferasi fibroblas menyebabkan penghambatan kontraksi *FPCL*. Mekanisme kerja 5FU pada

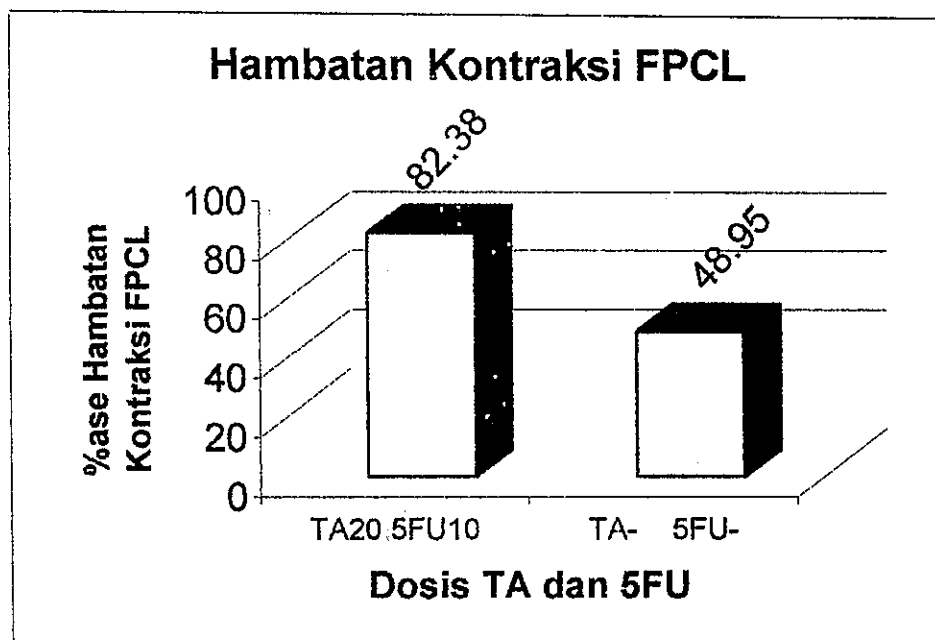
keloid adalah dengan mencegah reorganisasi matrik ekstraseluler serta menghambat kontraksi *Fibroblast Populated Collagen Lattice* (FPCL).²²



Grafik 4. Indek Proliferasi terhadap berbagai dosis 5FU

Grafik 4 menunjukkan indik proliferasi fibroblas terhadap berbagai dosis 5FU yang berbeda, penurunan indik proliferasi terbesar ada kelompok perlakuan TA-5FU10. Dengan uji *ANOVA* didapatkan perbedaan indik proliferasi yang bermakna secara statistik ($p=0,000$) antara keempat kelompok perlakuan. Uji *Tukey HSD* didapatkan perbedaan indik proliferasi yang bermakna antara kelompok kontrol dengan TA-5FU0,1 ($p=0,003$), kontrol dengan TA-5FU1 ($p=0,003$) dan kontrol dengan TA-5FU10 ($p=0,000$). kelompok perlakuan TA-5FU0,1 dengan TA-5FU10 ($p=0,002$), juga antara kelompok perlakuan TA-5FU1 dengan TA-5FU10 ($p=0,002$). Sedangkan indik proliferasi antara kelompok perlakuan TA-5FU0,1 dengan TA-5FU1 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna ($p=1,000$). Ini menunjukkan

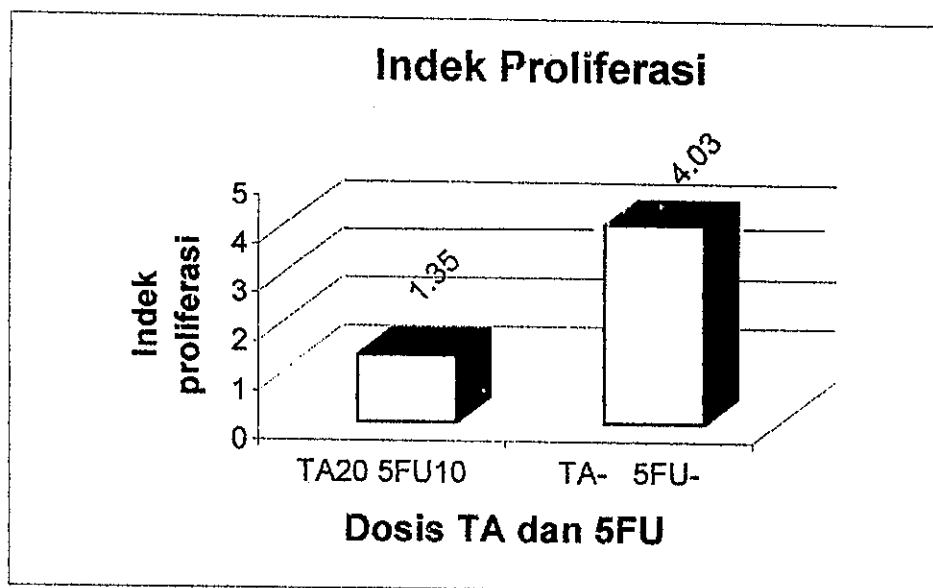
bahwa pemberian 5FU akan meningkatkan hambatan kontraksi *FPCL* yang berbanding lurus dengan dosis 5FU yang diberikan. Hambatan kontraksi *FPCL* tertinggi tampak pada kelompok perlakuan TA-5FU10. Ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan *Levinson* dkk yang menyatakan bahwa 5FU dosis rendah akan menghambat proliferasi fibroblas.²²



Grafik 5. Hambatan Kontraksi *FPCL* terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar dibandingkan kontrol.

Grafik 5 menunjukkan prosentase hambatan kontraksi *FPCL* terhadap kombinasi TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (20 μ m) + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (10 mg/ml) dibandingkan kontrol (tanpa

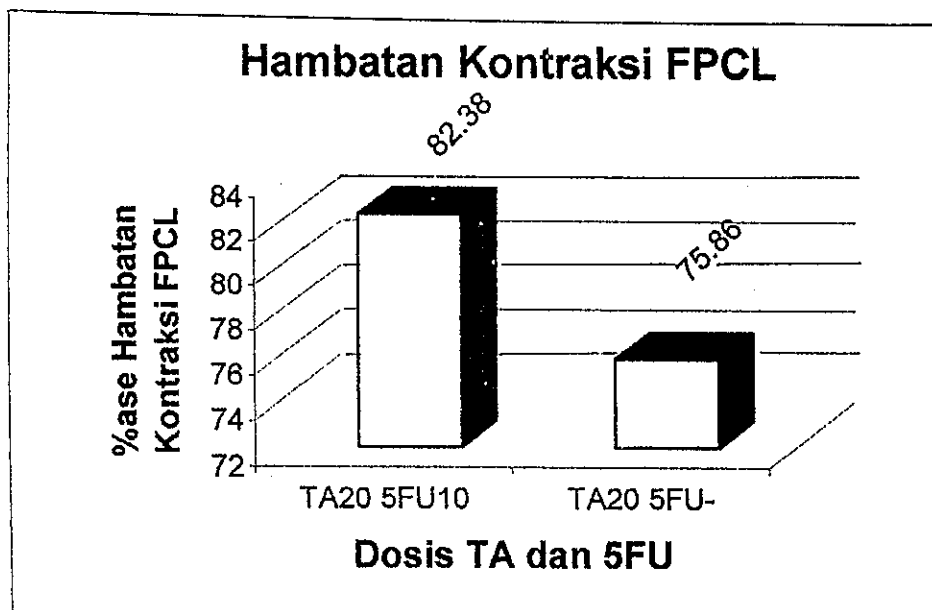
obat). Tampak bahwa hambatan kontraksi *FPCL* pada kelompok perlakuan TA20 5FU10 menghambat kontraksi *FPCL* yang lebih besar dibandingkan kontrol (tanpa obat). Pada *t-test* menunjukkan perbedaan hambatan kontraksi *FPCL* yang bermakna antara keduanya ($p=0,000$). Hal ini menunjukkan bahwa TA maupun 5FU mempunyai efek menghambat kontraksi *FPCL*. Ini sesuai dengan kepustakaan yang menyebutkan bahwa TA maupun 5FU mempunyai efek mencegah reorganisasi matrik ekstraseluler serta menghambat kontraksi *FPCL*.^{22,47,48}



Grafik 6. Indek Proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar dibandingkan kontrol.

Grafik 6 menunjukkan indk proliferasi fibroblas terhadap kombinasi TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (20 μ m) + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (10 mg/ml) dibandingkan kontrol (tanpa obat). Tampak

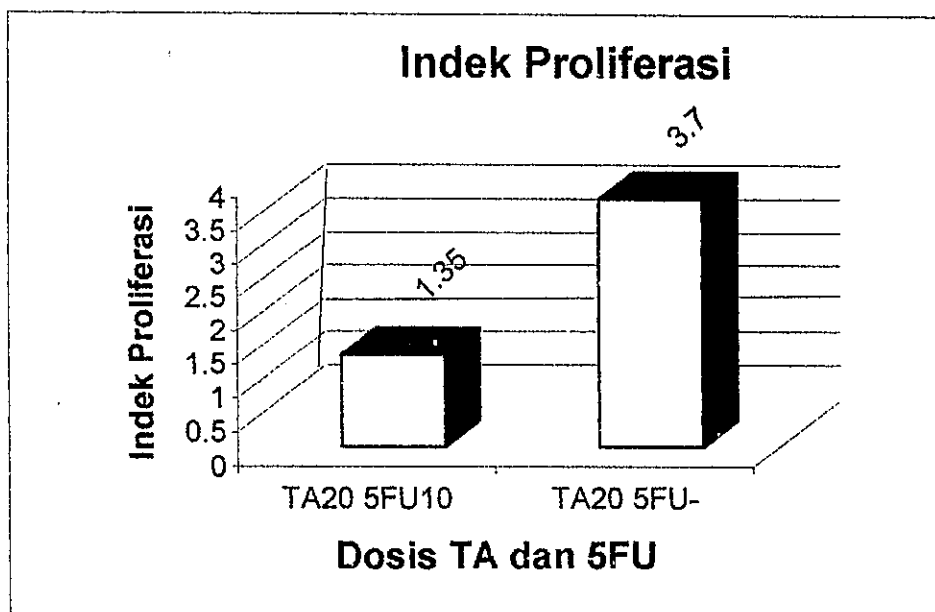
bahwa kombinasi TA dan 5FU menghambat proliferasi fibroblas lebih baik (1,35) dibandingkan kontrol (4,03). Pada *t-test* antara kelompok kontrol dan kelompok perlakuan TA20 5FU10 didapatkan perbedaan indek proliferasi yang bermakna ($p=0,000$). Hal ini disebabkan karena efek TA maupun 5FU dalam menghambat proliferasi fibroblas menyebabkan hambatan kontraksi *FPCL* .^{22,47,49}



Grafik 7. Hambatan Kontraksi *FPCL* terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar dibandingkan TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar.

Grafik 7 menunjukkan prosentase hambatan kontraksi *FPCL* terhadap kombinasi TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (20 μ m) + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (10 mg/ml) dibandingkan TA dosis yang

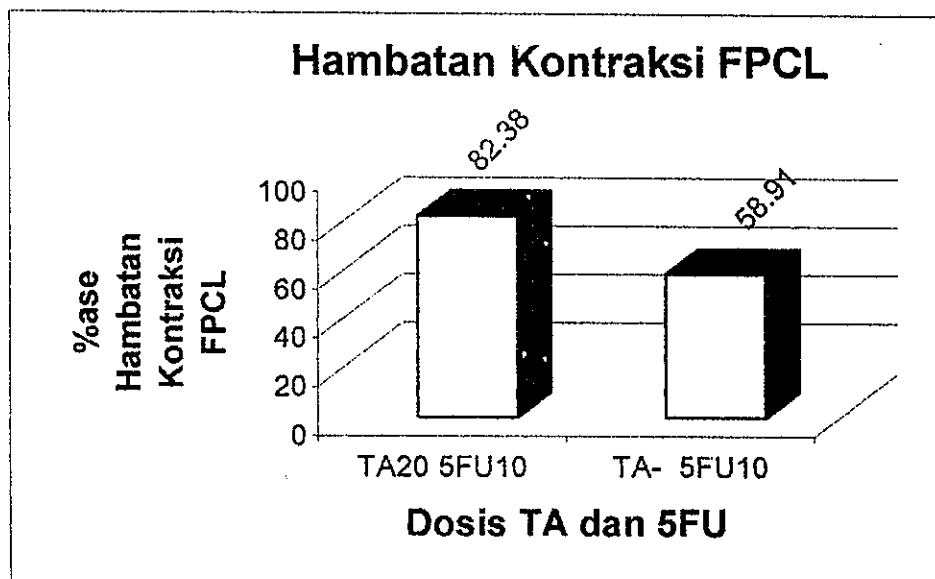
menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (20 μ m). Tampak bahwa kombinasi TA 20 μ m dan 5FU 10 mg/ml dapat menghambat kontraksi *FPCL* lebih baik (82,38%) dibandingkan TA tunggal (75,86%). Pada *t-test* antara kelompok perlakuan dosis TA20 5FU10 dan TA20 5FU- terdapat perbedaan hambatan kontraksi *FPCL* yang bermakna ($p=0,001$). Hal ini disebabkan efek TA maupun 5FU dalam menghambat kontraksi *FPCL* .^{22,48}



Grafik 8. Indek Proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar dibandingkan TA dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar .

Grafik 8 menunjukkan indk proliferasi antara kelompok perlakuan TA205FU10 dengan TA205FU-. Pada *t-test* didapatkan perbedaan indk proliferasi yang bermakna secara statistik ($p=0,009$) antara kedua kelompok. Hal ini disebabkan

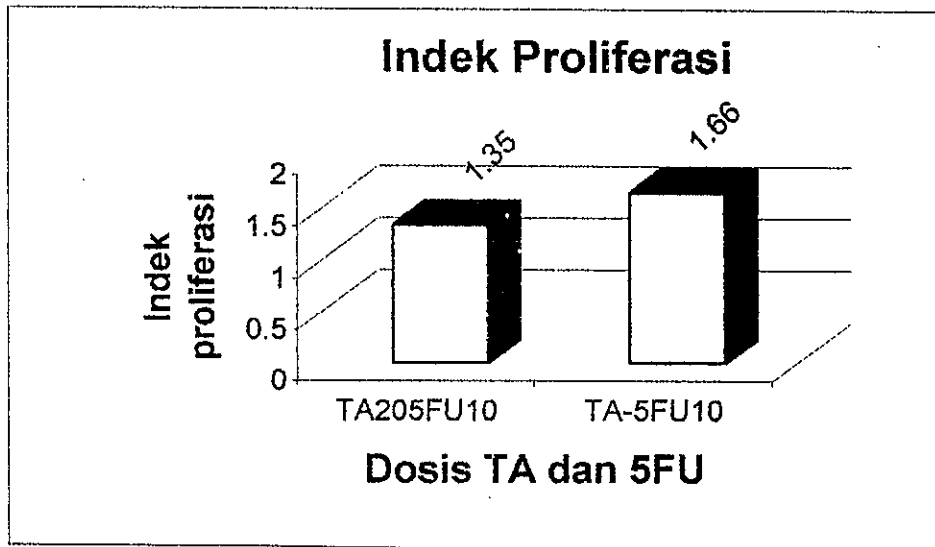
karena efek sinergisme TA dan 5FU dalam menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas sehingga menghambat indeks proliferasi.^{10,13,15,22,47,49}



Grafik 9. Hambatan Kontraksi *FPCL* terhadap TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar dibandingkan 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar.

Grafik 9 menunjukkan prosentase hambatan kontraksi *FPCL* terhadap kombinasi TA dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (20 η m) + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (10 mg/ml) dibandingkan 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar (10 mg/ml). Tampak bahwa kombinasi TA 20 η m dan 5FU 10 mg/ml dapat menghambat kontraksi *FPCL* lebih baik (82,38%) dibandingkan 5FU tunggal (58,91%). Hal ini disebabkan TA mempunyai efek antagonis terhadap kerja *Transforming Growth Factor- β* (*TGF-*

β) suatu stimulator kolagen dan protein matrix ekstraseluler yang dihasilkan oleh fibroblas, juga menstimulasi produksi *basic Fibroblast Growth Factor* (*bFGF*).^{10,13,47,49}



Grafik 10. Indek Proliferasi terhadap TA dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar + 5FU dosis yang menghambat kontraksi *FPCL* terbesar dibandingkan 5FU dosis yang menghambat indk proliferasi terbesar .

Pada grafik 10 dibandingkan indk proliferasi kelompok perlakuan TA20 5FU10 dengan TA-5FU10. Tetapi dengan *t-test* tidak didapatkan perbedaan indk proliferasi yang bermakna secara statistik antara keduanya ($p=0,083$). Hal ini kemungkinan disebabkan efek 5FU dalam menghambat proliferasi fibroblas lebih baik daripada TA karena 5FU bersifat anti proliferasi.^{15,22}

BAB.V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. TA dan 5FU mempunyai efek menghambat kontraksi *FPCL* dan menurunkan indeks proliferasi.
2. Kombinasi TA dan 5FU memberi hasil yang lebih baik daripada TA atau 5FU tunggal dalam menghambat kontraksi *FPCL*.
3. TA menunjukkan efek penghambatan indeks proliferasi yang tidak berbeda secara statistik antara kontrol, dosis 10 μ m dan 20 μ m.
4. 5FU menunjukkan efek penghambatan indeks proliferasi. Tidak ada perbedaan secara statistik antara dosis 5FU 0,1 mg/ml dan dosis 1 mg/ml tetapi terdapat perbedaan bermakna antara dosis 0,1 mg/ml dengan dosis 10 mg/ml dan antara dosis 1 mg/ml dengan 10 mg/ml.
5. Kombinasi TA dan 5FU menunjukkan penghambatan indeks proliferasi yang berbeda bermakna secara statistik dengan TA tunggal tetapi tidak berbeda secara statistik dengan 5FU tunggal.
6. Ada perbedaan sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas pada biakan fibroblas jaringan keloid yang dipapari kombinasi TA dan 5FU dibanding yang dipapari TA atau 5FU saja atau yang tidak dipapari TA atau 5FU (hipotesis diterima)

B. SARAN

1. Diperlukan penelitian lebih lanjut untuk menentukan dosis optimal kombinasi TA dan 5FU dalam menghambat sintesis kolagen dan proiferasi fibroblas secara *invivo*, uji pre klinis sampai uji klinis.

2. Desain penelitian serupa dapat dilakukan untuk penelitian dengan dosis-dosis dan kombinasi perlakuan yang lebih bervariasi.
3. Desain penelitian ini dapat diterapkan untuk penelitian dengan jenis obat lain untuk pengobatan keloid.
4. Penghitungan hambatan kontraksi *FPCL* dengan *Scion Image* sebaiknya dilakukan dengan metode dan alat yang lebih teliti karena kemungkinan *human error* cukup tinggi.

BAB VI RINGKASAN

Triamsinolon asetonid (TA) sering dipakai untuk pengobatan keloid yang diduga bekerja dengan menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas. Tetapi sampai saat ini belum ada pengobatan keloid yang hasilnya memuaskan sehingga pada penelitian ini dicobakan TA dan 5 Fluorourasil (5FU) secara tunggal maupun kombinasi dengan harapan dapat meningkatkan efeknya. Kultur fibroblas dan perlakuan dilakukan di laboratorium Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Gajahmada. Sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas dinilai dengan uji *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)* dan *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR)*.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *The Post Test-Only Control Group Design* yang menggunakan sel-sel fibroblas yang dikultur dalam sumuran sebagai obyek penelitian. Sampel dikelompokkan menjadi 12 kelompok perlakuan yang terdiri dari kelompok perlakuan kontrol (TA-5FU-), kelompok perlakuan pemaparan tunggal (TA10 5FU-, TA20 5FU-, TA-5FU0,1, TA-5FU1, TA-5FU10) dan kelompok perlakuan pemaparan kombinasi (TA20 5FU10). Hambatan *FPCL* dihitung dengan *Scion Image* dan Indeks Proliferasi dihitung berdasarkan rerata jumlah *NOR* dalam 100 sel. Percobaan dilakukan secara triplo.

Data-data yang diperoleh diuji beda dengan uji *ANOVA* dan *Independent t test* untuk mengetahui perbedaan pada kelompok-kelompok perlakuan. Perbedaan antar masing-masing kelompok perlakuan diuji dengan uji *Post Hoc Tukey*. Semua analisis dilakukan dengan komputer menggunakan program SPSS 10,01 *for Window*.

Hasil penelitian menunjukkan adanya perbedaan hambatan *FPCL* dan indeks proliferasi yang bermakna secara statistik antara kelompok perlakuan pemaparan tunggal dibandingkan dengan kelompok kontrol, adanya perbedaan hambatan *FPCL* antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dengan kelompok kontrol, adanya perbedaan hambatan *FPCL* antara kelompok perlakuan pemaparan kombinasi dibandingkan kelompok perlakuan tunggal tetapi tidak ada perbedaan indeks proliferasi yang bermakna secara statistik antara kelompok perlakuan pemaparan TA tunggal dibandingkan kelompok kontrol, antara kelompok perlakuan TA-5FU0,1

dan TA-5FU1 tetapi terdapat perbedaan yang bermakna secara statistik antara indeks proliferasi TA-5FU0,1 dengan TA-5FU10. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemaparan kombinasi TA dan 5FU dapat meningkatkan penghambatan sintesis kolagen secara bermakna yang berbanding lurus dengan dosis obat tetapi efek penurunan indeks proliferasi kombinasi TA dan 5FU tidak berbeda secara bermakna dengan 5FU tunggal, dan berbeda secara bermakna dengan TA tunggal.

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memperkaya informasi ilmiah mengenai khasiat TA dan 5FU terutama efek kombinasinya dalam menghambat sintesis kolagen dan proliferasi fibroblas jaringan keloid.

SUMMARY

Triamcinolone acetonide (TA) has frequently been used as a keloid therapy that was thought to have an inhibition on collagen synthesis and fibroblast proliferation. But up till now there is no satisfying result on keloid therapy. So that in this study we tried a combination of TA and 5FU in the hope to increase the effectiveness. Fibroblast culture and exposure were done at Dermatology and venereology Department Laboratorium, Faculty of Medicine, Gadjahmada University. Collagen synthesis and fibroblast proliferation were assessed by doing the *Fibroblast Populated Collagen Lattice (FPCL)* and *Agyrophylic Nucleolar Organizer Region (AgNOR) tests*.

This laboratory-experimental study was designed as a *Post test-only control group* using cultured fibroblast cells that was cultured in wells as experimental objects. All samples were divided into twelve treatment groups consisted of control group (TA-5FU-); single-exposed treatment groups (TA10 5FU-, TA20 5FU-, TA-5FU0,1, TA-5FU1, TA-5FU10) and combination-exposed treatment groups (TA20 5FU10). *FPCL* inhibition was assessed using *Scion Image* and proliferation index was assessed based on the average of NOR on 100 cells. Experiment was done triplo.

The data garnered was run on a differential test with *ANOVA* and *Independent t* tests to reveal the difference on the exposure groups. The difference between each group was run on *Post Hoc Tukey* test. All of the analysis was conducted by computer using SPSS 10,01 for window program.

It was shown in this study that there were significant differences on *FPCL* inhibition and proliferation index between single-exposed treatment groups with control group, *FPCL* inhibition between combination-exposed treatment groups with control group, between combination-exposed treatment groups with single-exposed treatment groups but there were no significant differences on proliferation index between TA single-exposed treatment groups with control group, between TA-5FU0,1 treatment groups and TA-5FU1 but there was a significant difference on proliferation index between TA-5FU0,1 and TA-5FU10.

It can be concluded that the combination-exposure of TA and 5FU could increase collagen synthesis inhibition significantly that was in proportion with the drug dose but there was no significant difference on proliferation index between combination TA and 5FU with single 5FU, yet there was a significant difference with single TA.

The result of the study is expected to be able to enrich scientific information about TA and 5FU effects, especially their combination effect in inhibiting collagen synthesis and fibroblast proliferation of the keloid tissue.

Key words : Triamcinolone acetonide, 5 Fluorouracil, *Fibroblast Populated Collagen Lattice* and *Axillary Nucleolar Organizer Region*.

Daftar Pustaka

1. Smith JW, Bellinger CG. Keloid and hypertrophic scar. Dalam : Grabb WC, Smith JW eds. Plastic surgery a concise guide to clinical practice, edisi ke-2. Boston : Little Brown & Co ; 1973 : 740-50.
2. Berman B, Bielewicz HC. Keloid. *J A Acad Dermatol*. 1995 ; 33 (1) : 117-23.
3. Falco OB, Plewig G, Wolff HH, Winkelmann RK. Mesenchymal tumors. Dalam : Dermatology ,edisi ke-3. Berlin : Springer-Verlag ; 1991 : 1046-53.
4. From L, Assaad D. Neoplasms, pseudoneoplasms, and hiperplasias of the dermis. Dalam : Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K., Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI, eds. Dermatology in general medicine, edisi ke-6. New York : Mc Graw Hill ; 2003 : 1163-5.
5. Dzubow LM, Rosenman H. Papules, plaques, nodules and cysts. Dalam : Bondi EE, Jegasothy BV, Lazarus GS, eds. Dermatology diagnosis and therapy. London : Prentice Hall International Inc, 1991 :117-9.
6. Arnold HL, Odom RB, James WB. Dermal and subcutaneous tumors. Dalam : Andrew's diseases of the skin, edisi ke-8. Philadelphia : W.B.Saunders Co ; 1990 : 708-10.
7. Ceilly RL. The treatment of hypertrophic scars and keloids. Dalam : Epstein E. & Epstein E.Jr.eds. Skin surgery. Philadelphia : W.B.Saunders Co ; 1987 : 580-6.
8. Shaffer JJ, Taylor SC, Bolden FC. Keloidal scars : A review with a critical look at therapeutic options. *J Am Acad Dermatol*. 2002; 46:S63-97.
9. Stegman SJ , Tromovitch TA. Cosmetic dermatologic surgery. Chicago : Year book medical Publishers Inc ; 1984 : 157-61.
10. Pollack SU. Management of keloids. Dalam : Wheeland RG. Cutaneous surgery. Philadelphia : W.B.Saunders Co ; 1994 : 688-98.
11. Cohen IK, Diegelmann RF. The biology of keloid and hypertrophic scars and the influence of corticosteroid. *Clinical Plastic Surgery* ;1977 : 297-310.
12. Dover JS. Pocket guide to Cutaneous medicine and surgery. Philadelphia : W.B.Saunders ; 1996 : 309-10.
13. Berman.B, Flores F. Recurrence rates of excised keloids treated with postoperative triamcinolone acetanide injections or interferon alfa-2b injections. *J Am Acad Dermatol* 1997;37:755-7
14. Nanda S, Reddy BSN. Intralesional 5-Fluoruracil as a Treatment modality of keloids. Didapat dari :<http://www-blackwell-synergy.com/>
15. Fitzpatrick RE. Treatment of inflamed hypertrophic scars using intralesional 5-FU. *Dermatol Surg* 1999 ; 25 : 224-32.
16. Adams BB, Gloster HM. Surgical pearl : Excision with suprakeloidal flap and radiation therapy for keloids. *J Am Acad Dermatol* 2002;47:307-9.
17. Manuskiatti W, Fitzpatrick RE, Goldman MP. Energy density and numbers of treatment affect response of keloidal and hypertrophic

- sternotomy scars to the 585-nm flashlamp-pumped pulsed-dye laser. *J Am Acad Dermatol* 2001;45:557-65.
18. Roseborough IE, Grevious MA, Lee RC. Prevention and treatment of excessive dermal scarring. *J Natl Med Assoc* 2004;96:108-16.
 19. Ono N. Pain-free intralesional injection of triamcinolone for the treatment of keloid. *Scand J Plast Reconstr Surg hand Surg*. 1999 Maret ; 33(1) : 89-91.
 20. Teelucksingh S, Balkaran B, Ganeshmoorthi A, Arthur P. Prolonged childhood Cushing's syndrome secondary to intralesional triamcinolone acetone. *Ann Trop Paediatr* 2002 Maret ; 22(1) : 89-91 (abstract).
 21. Kumar P, Adolph S. Hypopigmentation along subcutaneous veins following intrakeloid triamcinolone injection : a case report and review of literature. *Burns* 1998 Agustus : 24(5) : 487-8.
 22. Levinson H, Liu W, Peled Z. 5-Fluorouracil inhibits keloid fibroblast proliferation and keloid fibroblast populated collagen lattice contraction. Dipublikasikan 15 Januari 2002. Didapat dari : <http://www.journalofburns.com>
 23. Koh HK, Bhawan J. Tumors of the skin. Dalam : Moschella SL, Hurley HJ. eds. *Dermatology*, edisi ke-3, vol 2. Philadelphia : W.B. Saunders Co; 1992 : 1769-70.
 24. Ketchum LD, Cohen IK, Masters FW. Hypertrophic scars and keloids : a collective review *Plastic Reconstr. Surg* .1974 ; 53 : 140-54.
 25. Machie RM. Soft Tissue Tumor. Dalam : Champion R.H., Burton J.L., Ebling F.J.G. eds. *Textbook of dermatology*, edisi ke-5. London : Blackwell Scientific Publ ; 1992 : 2073-100.
 26. Gilchrist BA. Relationship between actinic damage and chronologic aging in keratinocyte cultures of human skin. *J Invest Dermatol* 1979;72(5):219-23.
 27. Clark RAF. Cutaneous tissue repair : Basic biologic considerations I. *J.Am.Acad.Dermatol*. 1985 ; 13 : 701-25.
 28. Babin RW, Ceilly RI. Combined modalities in the management of hypertrophic scars and keloids. *J Otolaryngol* 1979 ; 8 : 457-60.
 29. Uitto J, Eisen AZ. Collagen. Dalam : Fitzpatrick TB., Freedberg IM., Eisen AZ., Wolff K, Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. eds. *Dermatology in general medicine*, edisi ke-6. New York : Mc Graw Hill ; 2003 : 165-78.
 30. El-Domyati M, Attia S, Saleh F, Brown D, Birk DE, Gasparro F, Ahmad H, Uitto J. Intrinsic aging vs. photoaging : a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 2002 :11:398-405.
 31. Cormack DH. Introduction to histology, edisi ke-3. Philadelphia : J.B.Lippincott Co ; 1984 : 103-10.
 32. Junqueira LC, Carneiro J. Basic histology, edisi ke-3. California : Lange Medical Publication ; 1982 : 89-94.
 33. Falanga V. Mechanism of cutaneous wound repair. Dalam : Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K, Austen KF,

- Goldsmith LA, Katz SI. eds. Dermatology in general medicine, edisi ke-6. New York : Mc Graw Hill ; 2003 : 236-45.
34. Burgeson RE. Genetic heterogeneity of collagens. *J Invest Dermatol* 1982 ; 79 suppl 1 : 253.
 35. Lever WF, Schumburg-Lever G. Tumor of fibrous Tissue. Dalam : Histopathology of the skin, ed 7. Philadelphia : J.B.Lippincott Co ; 1990 : 668-9
 36. Harris ED.Jr., Krane SM. Collagenes. *N.Engl.J.Med.* 1974 ;291:d 557,605,650.
 37. Freshney RI. Primary culture. Dalam : Culture of animal cells, A manual of basic technique, edisi ke-4. United States : Wiley-Liss Inc.; 2000 : 149-75.
 38. Gilchrist BA. Prior Chronic Sun Exposure Decreases The Lifespan of Human Skin Fibroblasts in vitro.*J Geront* 1980;35(4):537-41.
 39. Marks R, Dykes P, Motley R. Clinical Signs and Procedures in Dermatology. London : Martin Dunitz Ltd ; 1993 : 140-5.QA
 40. Assessment of collagen lattice thickness by B-scan echography. *Skin Research and Technology*.2002;8:173-7.
 41. Fibrinogen inhibits fibroblast-mediated of collagen. September 2003. Didapat dari:
<http://search.epnet.com/direct.asp?an=10711693&db=byh>.
 42. Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC. A Wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *International society for artificial organs*.2003, 27(8):701-5.
 43. Crocher J., Boldy D.A.R., Egan M.J. How should we count AgNORs? Proposals for a standardized approach. *J.Pathol* 1989;158:135-88.
 44. Barzilai A, Goldberg I, Yulash M, et al. Silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as a prognostic value in malignant melanoma. *Am J.Dermatopathol* 1998;20:5,473-7.
 45. MacKie R.M., White S.I., Seywright M.M. dkk. An assesment of the value of AgNOR staining in the identification of dysplastic and other borderline melanocytic naevi. *Br.J.dermatol.* 1989;120,511-6.
 46. Ghazizadeh M., Miyata N., Sasaki Y., Arai K., Aihara K. Silver-stained nucleolar organizer regions in hypertrophic and keloid scars. *Am .J.Dermatopathol.* 1997; 19:5,468-72.
 47. Reynolds JEF. Corticosteroids. Dalam : Martindale the extra pharmacopoeia, edisi ke-29. London : The Pharmaceutical Press ; 1989 : 901-2.
 48. Werth VP, Lazarus GS. Systemic glucocorticoids. Dalam : Fitzpatrick TB, Freedberg IM, Eisen AZ, Wolff K,Austen KF, Goldsmith LA, Katz SI. eds. Dermatology in general medicine, edisi ke-6. New York : Mc Graw Hill ; 2003 : 2783-8.
 49. Farrior RT, Stambaugh KI. Keloids and hypertrophics scars. Dalam : Thomas J.R., Holt G.R. Facial scars incision, revision & camouflage. St Louis : Mosby Co; 1989 : 210-28.
 50. Carroll LA, Hanasono MM, Mikulec AA, Kita M, Koch RJ. Triamcinolone stimulates bFGF production and inhibits TGF- β ,

production by human dermal fibroblast. *Dermal Surgery* 2002;28:704-9.

51. Newsome RE, Langston K. Wound healing, keloids. *EMedicine Journal of plastic surgery*, Juni 2002. Didapat dari :<http://www.emedicine.com/plasticsurg/topic404.htm>
52. Reynolds JEF. Antineoplastic agents and immunosuppressants. Dalam : *Martindale the extra pharmacopoeia*, edisi ke-29. London : The Pharmaceutical Press ; 1989 : 628-31.
53. Fluorouracil. Desember 2003. Didapat dari : [file:///A:/Fluorouracil \(51-21-8\) index from Fluoride Action Network Pesticide Project.htm](file:///A:/Fluorouracil%20(51-21-8)%20index%20from%20Fluoride%20Action%20Network%20Pesticide%20Project.htm)